

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Caracterização Genómica e Epigenética de Biópsias de Carcinoma Basocelular

Laura Maria Silvério Domingues

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Dissertação orientada por:
Prof^ª. Doutora Isabel Carreira
Prof^ª. Doutora Helena Caria

2018

*“Não é certo que o meu corpo faça aquilo que eu digo
Nuns dias tenho coragem e nos outros não consigo
Se nos está nos genes deve ser genial
Um retoque bioquímico ao plano original”*

A Estrada, Anaquim

Agradecimentos

À Professora Doutora Isabel Marques Carreira, quero agradecer ter aceite a orientação do meu trabalho e por me ter dado a oportunidade de presenciar o dia-a-dia de um laboratório de diagnóstico pré e pós-natal. Agradeço ainda todas as aulas que tive o privilégio de presenciar e todos conhecimentos que de uma forma mais séria ou através de histórias que ficam na memória me transmitiu.

À Doutora Ilda Ribeiro, agradeço todas as horas que esperou por trabalho feito e por tantas outras que despendeu para me ajudar a que este projeto tivesse sucesso.

Ao Dr. José Carlos Cardoso, do Serviço de Dermatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, por ter aceite a colaboração neste projeto, pela colheita das amostras e por toda a disponibilidade que sempre mostrou.

A todos os participantes do estudo, doentes e não doentes, por terem disponibilizado as suas amostras biológicas tão essenciais para este projeto.

À Professora Doutora Helena Caria, por ter aceite ser a ponte entre este projeto, o Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Ao Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, quero agradecer a forma como fui acolhida, a forma como me integraram em todas as atividades do laboratório e da faculdade. Em especial, agradeço ao Miguel todas as vezes que me disponibilizou o termociclador e todas as outras que, mesmo sem tempo, não deixou de me explicar tudo o que eu não entendia.

À minha família, agradeço tudo o que fizeram e fazem por mim, sem os vossos “então, estás melhor?”, “estás por cá?”, “já acabaste?” tinha sido bem mais difícil chegar ao final deste projeto. Do avô espero ter ficado com o gene da vontade de viver.

Aos amigos, que nunca deixaram que os períodos mais complicados fossem de tristeza e que sempre me disseram “tu consegues!”, guardo-vos para sempre.

A Coimbra, onde vivi tanto e com tantos, obrigada por tudo e todos os que me deste a conhecer, espero voltar.

Resumo

O carcinoma basocelular é um tumor maligno cutâneo que se desenvolve a partir das células basais da epiderme e dos folículos pilosos e é o cancro cutâneo mais comum entre os cânceros de pele não melanoma, representando 80% dos casos. A sua distribuição corporal incide maioritariamente na cabeça e pescoço, aparece com maior frequência no sexo masculino e a nível mundial o país com maior incidência é a Austrália. O principal fator de risco para este tipo de tumor cutâneo é a exposição à radiação, como a radiação UV e a radioterapia. Neste trabalho foi feita uma caracterização genómica, por array-CGH, e uma caracterização epigenética, por MS-MLPA de 28 biópsias de carcinoma basocelular, divididas em 2 grupos: 1) 14 amostras provenientes de doentes com histórico de radioterapia para tratamento de *tinea capitis* durante a infância; 2) 14 amostras provenientes de doentes com tumores esporádicos localizados em áreas cronicamente expostas a radiação UV. Uma vez que não há nenhum estudo publicado sobre a caracterização molecular do carcinoma basocelular, os resultados obtidos são inovadores. Por array-CGH ambos os grupos estudados apresentaram variações no número de cópias características do grupo, como a perda da região 9q21.11-q22.33 no grupo de amostras pós-radioterapia, contudo também mostraram a presença de alterações, quer ganhos quer perdas no número de cópias, comuns aos dois grupos estudados, tais como o ganho nas regiões 2q37.3, 6p25.3, 12p13.31, 14q32.33 e 15q26.1 e a perda nas regiões 3q26.1, 5q11.1, 8p11.22, 17q21.31 e Xq21.1. Relativamente aos resultados obtidos para o padrão de metilação das amostras estudadas, destacam-se os genes *RARB* e *CD44* como estando metilados nos tumores de carcinoma basocelular. Com estes resultados foi possível identificar algumas variações no número de cópias e no padrão de metilação de genes que são características dos carcinomas basocelulares e que futuramente poderão ser utilizadas para diagnósticos moleculares e determinação de prognósticos e tratamentos.

Palavras-chave: Carcinoma basocelular; Array-CGH; MS-MLPA; Variações no número de cópias; Metilação.

Abstract

Basal cell carcinoma is a malignant cutaneous tumour that develops from the basal cells of the epidermis and hair follicles. It's the most common within non-melanoma skin cancers, accounting for 80% of cases. This cancer mainly appears in the head and in the neck, and manifest more frequently in males, being that Australia is the country with the highest incidence. The main risk factor for this type of cutaneous tumour is exposure to radiation, such as UV radiation as radiation therapy. In this work a genomic characterization was performed by array-CGH and an epigenetic characterization by MS-MLPA of 28 basal cell carcinoma biopsies, divided into 2 groups: 1) 14 samples from patients with a history of radiotherapy for the treatment of *tinea capitis* during childhood; 2) 14 samples from patients with sporadic tumours located in areas continuously exposed to UV radiation. Since there is no published study on the molecular characterization of basal cell carcinoma, the results obtained are innovative. By array-CGH both groups presented copy number variations characteristic of the group, such as the loss of the region 9q21.11-q22.33 in the group of samples after radiotherapy. They but also showed the presence of alterations, either gains or losses, in the number of copies, that are common to the two groups studied, such as the gain in the regions 2q37.3, 6p25.3, 12p13.31, 14q32.33 and 15q26.1 and the loss in the regions 3q26.1, 5q11.1, 8p11.22, 17q21.31 and Xq21.1. Regarding the results obtained for the methylation profile of the studied samples, the *RARB* and *CD44* genes stand out as being

methyated in basal cell carcinoma tumours. With these results it was possible to identify some copy number variations and changes in the methylation profile of genes that are characteristic of the basal cell carcinoma and that in the future may be used for molecular diagnostics and determination of prognoses and treatments.

Key-words: Basal cell carcinoma; Array-CGH; MS-MLPA; Copy number alterations; Methylation.

Índice

| | |
|---|------|
| Dedicatória | i |
| Agradecimentos..... | iii |
| Resumo..... | v |
| Abstract | v |
| Índice de figuras | viii |
| Índice de tabelas | ix |
| Abreviaturas | x |
| 1 Introdução | 1 |
| 1.1 Caracterização clínica..... | 1 |
| 1.2 Epidemiologia | 2 |
| 1.3 Fatores de Risco | 3 |
| 1.3.1 <i>Tinea capitis</i> | 5 |
| 1.4 Alterações genéticas descritas | 6 |
| 1.4.1 Alterações genéticas induzidas pela radiação..... | 7 |
| 1.5 Tratamento | 8 |
| 1.6 Técnicas Laboratoriais | 8 |
| 1.6.1 Array-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) | 8 |
| 1.6.2 Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA) | |
| 10 | |
| 2 Objetivos | 11 |
| 3 Materiais e Métodos | 12 |
| 3.1 Seleção e colheita de amostras | 12 |
| 3.2 Extração e quantificação de DNA | 12 |
| 3.3 Estudo Genómico | 13 |
| 3.4 Estudo Epigenético..... | 13 |
| 4 Resultados e Discussão | 13 |
| 4.1 Grupo doentes com histórico de radioterapia..... | 14 |
| 4.1.1 Caracterização do grupo..... | 14 |
| 4.1.2 Resultados array-CGH | 14 |
| 4.1.3 Resultados MS-MLPA | 18 |
| 4.1.4 Comparação..... | 21 |
| 4.2 Grupo doentes com tumores esporádicos | 21 |
| 4.2.1 Caracterização do grupo..... | 21 |
| 4.2.2 Resultados array-CGH | 21 |
| 4.2.3 Resultados MS-MLPA | 24 |
| 4.2.4 Comparação..... | 28 |

| | |
|--|----|
| 5 Comparação final/ Conclusões finais..... | 28 |
| 6 Referências Bibliográficas | 30 |
| Anexos..... | 35 |

Índice de figuras

Figura 1.1. Fotografias reais representativas dos principais subtipos de carcinoma basocelular. A) Subtipo Nodular [7]; B) Subtipo Superficial [8]; C) Subtipo Infiltrativo [7]. 1

Figura 1.2. Representação esquemática da distribuição corporal do carcinoma basocelular, no geral, e dos 3 subtipos principais identificados (Nodular, Superficial e Infiltrativo). Na imagem representativa do corpo humano são apresentadas as percentagens da distribuição do CBC em geral. Cada gráfico circular corresponde a uma região corporal diferente e representa a distribuição dos 3 principais subtipos de CBC em cada uma dessas regiões, o valor percentual apresentado corresponde sempre ao subtipo de CBC que, em cada região, tem maior incidência. Imagem adaptada de Scrivener et al (2002) [9]. 2

Figura 1.3. Representação gráfica da distribuição por sexo e idade da frequência do carcinoma basocelular. Os valores relativos aos intervalos de idades <20 e 20-29 anos são inferiores a 1% para ambos os sexos e, portanto, a sua representação é praticamente oculta. Os dados representados foram retirados de Harris R. B. et al (2001) [16]. 3

Figura 1.4. Composição de imagens reais representativas das principais síndromes hereditárias que têm como consequência maioritária o aparecimento de múltiplos CBCs [22]. A) Síndrome de Gorlin-Goltz (OMIM 109400) [23]; B) Síndrome de Rombo (OMIM 180730) [26]; C) Síndrome Bazex-Dupré-Christol (OMIM 301845) [27] 5

Figura 1.5. Representação esquemática das principais etapas da técnica de array-CGH: marcação do DNA em estudo com o fluorocromo Cy5 e do DNA controlo com o fluorocromo Cy3, mistura dos dois DNA's, co-hibridização dos DNA's com as sondas de oligonucleótidos na lâmina de array, deteção da fluorescência através de um scan de microarrays e análise dos resultados. Imagem adaptada de Colaianni et al, 2016 [53]. 9

Figura 1.6. Representação esquemática das hemi-sondas de MS-MLPA. A vermelho está representada a sequência de DNA da amostra em estudo, estando ainda representado um local de metilação, uma vez que as sondas de MS-MLPA hibridizam em ilhas CpG. Imagem adaptada de Homig-Holzel, C. and S. Savola, 2012 [36]. 10

Figura 1.7. Representação esquemática das 4 principais etapas da técnica de MS-MLPA. 1 - Desnaturação do DNA da amostra; 2 - Hibridização das hemi-sondas com o DNA da amostra durante 16h; 3A - Ligação das duas hemi-sondas com auxílio de uma enzima ligase; 3B – Ligação das duas hemi-sondas com auxílio de uma enzima ligase e posterior digestão por ação de uma enzima de restrição sensível a metilação; 4 – Amplificação por PCR das sondas ligadas e não digeridas. Na representação das sondas, a azul está representada a sequência de hibridização, a verde a sequência stuffer e a preto o local de ligação aos *primers*. Imagem adaptada do protocolo MRC-Holland, 2016 [62]. 11

Figura 4.1. Idiograma representativo das alterações encontradas, pela técnica de array-CGH, nas amostras tumorais de carcinoma basocelular de doentes com histórico de radioterapia. Cada cor representada corresponde a um dos 14 doentes estudados. À esquerda dos cromossomas

estão representadas as perdas no número de cópias na posição correspondente, enquanto à direita do cromossoma estão representados os devidos ganhos no número de cópias. 16

Figura 4.2. Gráfico representativo das alterações no número de cópias encontradas nas amostras tumorais do grupo de doentes com histórico de radioterapia, pela técnica de MS-MLPA. A vermelho estão representadas as perdas no número de cópias dos 38 genes estudados e a azul os respetivos ganhos encontrados. 19

Figura 4.3. Gráfico representativo das alterações no número de cópias encontradas nas amostras não tumorais do grupo de doentes com histórico de radioterapia, pela técnica de MS-MLPA. A vermelho estão representadas as perdas no número de cópias dos 38 genes estudados e a azul os respetivos ganhos encontrados. 19

Figura 4.4. Representação gráfica dos genes apresentados metilados no grupo de doentes com histórico de radioterapia e o respetivo número de amostras, resultados obtidos pela técnica de MS-MLPA A amarelo encontram-se representadas as amostras tumorais e a verde as amostras não tumorais. 20

Figura 4.5. Idiograma representativo das alterações encontradas, pela técnica de array-CGH, nas amostras tumorais de carcinoma basocelular de doentes com tumores esporádicos. Cada cor representada corresponde a um dos 14 doentes estudados. As alterações apresentadas à esquerda dos cromossomas representam as perdas no número de cópias na posição correspondente, enquanto as alterações apresentadas à direita dos cromossomas representam os devidos ganhos no número de cópias. 23

Figura 4.6. Gráfico representativo das alterações no número de cópias identificadas nas amostras tumorais do grupo de doentes com tumores esporádicos, pela técnica de MS-MLPA. A vermelho estão representadas as perdas no número de cópias dos 38 genes estudados e a azul os respetivos ganhos encontrados. 25

Figura 4.7. Gráfico representativo das alterações no número de cópias observadas nas amostras não tumorais do grupo de doentes com tumores esporádicos, pela técnica de MS-MLPA. A vermelho estão representadas as perdas no número de cópias dos 38 genes estudados e a azul os respetivos ganhos encontrados. 25

Figura 4.8. Representação gráfica dos genes apresentados metilados no grupo de doentes com tumores esporádicos e o respetivo número de amostras, resultados obtidos pela técnica de MS-MLPA A amarelo encontram-se representadas as amostras tumorais e a verde as amostras não tumorais. 27

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Resumo dos valores de incidência do carcinoma basocelular em vários países do globo. Os valores apresentados encontram-se em número de novos casos por cada 100 000 habitantes por ano. É necessário ter em conta que os valores de incidência apresentados na tabela podem estar subestimados pois, no século passado, nem todos os casos de CBC eram reportados e muitos outros eram mal diagnosticados sendo muitas vezes registados como psoríase, eczema numular ou discoide, entre outras doenças cutâneas [6]. 3

Tabela 3.1. Caracterização do conjunto de amostras estudado. 12

Abreviaturas

AMPK – Cinases dependentes de AMP cíclico
ANXA1 (OMIM 151690) – Annexin A1
Array-CGH – Array – Comparative Genomic Hybridization
ATP – Adenosina Trifosfato
BICD2 (OMIM 609797) – Bicaudal D2, Homolog of *Drosophila*
CBC – Carcinoma Basocelular
CD44 (OMIM 107269) – CD44 Antigen
Cdc6 – Cell Division Cycle 6
CDH13 (OMIM 601364) – Cadherin 13
CEP78 (OMIM 617110) – Centrosomal Protein 78 kD
CHFR (OMIM 605209) – Checkpoint Protein with FHA and Ring finger domains
CKS2 (OMIM 116901) – CDC2-Associated Protein CKS2
CNV – Copy Number Variations
CREM (OMIM 123812) – cAMP Response Element Modulator
CYP2D6 (OMIM 124030) – Cytochrome P450, Subfamily IID, Polipeptide 6
DHH – Desert Hedgehog
DSP – Dual Specific Phosphatases
DUSP22 (OMIM 616778) – Dual Specificity Phosphatase 22
FANCC (OMIM 613899) – FANCC gene
FBXO45 (OMIM 609112) – F-box Only Protein 45
FGD3 (OMIM 617554) – Fyve, RhoGEF and PH Domain-containing protein 3
FISH – Fluorescence *in vitro* Hybridization
FOXB2 - Forkhead Box B2
FOXC1 (OMIM 601090) – Forkhead Box C1
FRMD3 (OMIM 607619) – Ferm Domain- containing Protein 3
FXN (OMIM 606829) – Frataxin
GADD45G (OMIM 604949) – Growth Arrest and DNA Damage-inducible gene GADD45
GAS1 (OMIM 139185) – Growth Arrest-Specific 1
Glut-1 (OMIM 138140) – Glucose Transporter 1
GNAQ (OMIM 600998) – Guanine Nucleotide -Binding Protein, Q polipeptide
GSMT1
GSTT1 (OMIM 600436) – Glutathione S-transferase, theta 1
HH – Hedgehog
HIF – Hypoxia Inducible Factor
HNSCC – Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
IHH – Indian Hedgehog
INK4A (OMIM 600160) – Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2 A
JNK – Jun N-terminal Kinase
KIF27 (OMIM 611253) – Kinesin Family Member 27
KLF9 (OMIM 60292) – Kruppel-Like Factor 9
MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase
MGMT (OMIM 156569) – Methylguanine-DNA Methyltransferase
MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MMP7 – Metaloproteinase 7
MS-MLPA – Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
NAA35 (OMIM 617989) – N-Alfa Acetyltransferase 35
NF-kB – Nuclear Factor kB

NMSC – Non Melanoma Skin Cancer
OGN (OMIM 602383) – Osteoglycin
PAH (OMIM 612349) – Phenylalanine Hydroxylase
PAK2 (OMIM 605022) – p21 Protein-Activated Kinase 2
PAR1 – Região pseudoautosômica 1
PAX5 (OMIM 167414) – Paired Box Gene 5
 PCR – Polimerase Chain Reaction
PCSKS (OMIM 607786) – Proprotein Convertase, Subtilisin/Kexin-type
PDGF (OMIM 190040) – Platelet-Derived Growth Factor
PGM5 (OMIM 600981) – Phosphoglucomutase 5
PP2A – Subunidade reguladora β da proteína fosfatase A
PPP2R3B (OMIM 300339) – Protein Phosphatase 2, Regulatory Subunit B-Double Prime, Beta
 pRb – Proteína Retinoblastoma
PRKACG (OMIM 176883) – Protein Kinase cAMP Dependent Catalytic Gama
PRUNE2 (OMIM 610691) – Prune2, Homolog of *Drosophila*
PTCH1 (OMIM 601309) – Patched 1, Homolog of *Drosophila*
PYCARD (OMIM 606838) – PYD and CARD Domain-Containing Protein
RARB (OMIM 180220) – Retinoic Acid Receptor Beta
 RE α – Recetor de estrogénio alfa
RFK (OMIM 613010) – Riboflavin Kinase
RM11 (OMIM 610404) – RecA-mediated genome instability
RNF168 (OMIM 612688) – Ring Finger Protein 168
 SCC – Squamous Cell Carcinoma
SEMA4D (OMIM 601866) – Semaphorin 4D
SEN5 (OMIM 612845) – Sentrin-Specific Protease Family, member 5
 SHH – Sonic Hedgehog
SHOX (OMIM 312865) – Short Stature Homeobox
SMC5 (OMIM 609386) – Structural Maintenance of Chromosome 5
 SMO – Smothered
SPIN1 (OMIM 612583) – Spinster 1, Homolog of *Drosophila*
STK11 (OMIM 602216) – Serin/Treonin Protein Kinase 11
 TGF α (OMIM 190170) – Transforming Growth Factor Alfa
TNF- α (OMIM 191160) – Tumor necrosis factor alfa
TP53 (OMIM 191170) – Tumor protein p53
 UV – Ultravioleta
VEGF (OMIM 192240) – Vascular Endothelial Growth Factor
VHL (OMIM 608537) – VHL gene
WT1 (OMIM 194070) – Wilms Tumor 1

1 Introdução

O carcinoma basocelular (CBC) é o mais comum entre os cânceros de pele não melanoma (NMSC) representando 80% dos casos [1]. Também conhecido como carcinoma de células basais ou basalioma, o CBC é um tumor epitelial maligno, com crescimento lento [2], localizado e indolor [3].

Sabe-se que o CBC se desenvolve a partir das células epiteliais, contudo a sua histogénese ainda não está bem caracterizada, pensando-se que o tumor surge a partir das células basais da epiderme e/ou dos folículos pilosos [4]. A renovação das células da epiderme faz-se a partir das células da camada basal, que estão constantemente em divisão e ao diferenciar-se dão origem aos restantes tipos celulares presentes na epiderme [5]. Desta forma, quando os processos de regulação celular são alterados e deixam de funcionar corretamente, as células basais começam a dividir-se de forma alterada e começa a formar-se uma massa tumoral à qual se dá a designação de carcinoma basocelular.

Geralmente, os tumores de CBC são pequenos, translúcidos e com bordos elevados nos quais se destacam vasos sanguíneos dilatados (telangiectasias) [6]. O seu crescimento é localizado na área de origem apesar dos tumores do tipo infiltrativo terem tendência a invadir os tecidos adjacentes de forma tridimensional [2].

Este tipo de cancro cutâneo é diagnosticado por observação e suspeita clínica com posterior realização posterior de biópsia para confirmação do diagnóstico e identificação do subtipo tumoral por exame histopatológico.

1.1 Caracterização clínica

O carcinoma basocelular é classificado clínica e histologicamente tendo em conta a sua aparência e morfologia. Assim, e com base em características clínicas e/ou patológicas, estão descritos na literatura vários subtipos de CBC, como por exemplo: infiltrativo, nodular, pigmentado, quístico, superficial, ulcerado, entre outros [2]. Contudo, frequentemente, são classificados em três subtipos principais (figura 1.1): nodular (figura 1.1 A) [7], identificado em 62-70% dos casos de CBC, caracterizado por um padrão de crescimento sólido que se traduz habitualmente, do ponto de vista clínico, por um nódulo brilhante com telangiectasias em superfície, podendo por vezes apresentar ulceração central; superficial (figura 1.1 B) [8], identificado em 9-17.5% dos casos de CBC, caracterizado pela presença de pequenos ninhos subepidérmicos, correspondendo clinicamente a uma placa eritematosa com superfície descamativa e/ou erosiva; infiltrativo (figura 1.1 C) [7], identificado em 0.5-16.6% dos casos de CBC, quando o tumor surge clinicamente como uma lesão de limites mal definidos e frequentemente com aspeto esbranquiçado semelhante a tecido cicatricial e é constituído por finos cordões que dissecam o tecido conjuntivo circundante [1, 9]. Estes três subtipos são distinguidos por apresentarem relevância clínica, pois traduzem características distintas com consequências do ponto de vista do diagnóstico, prognóstico e terapêutico.

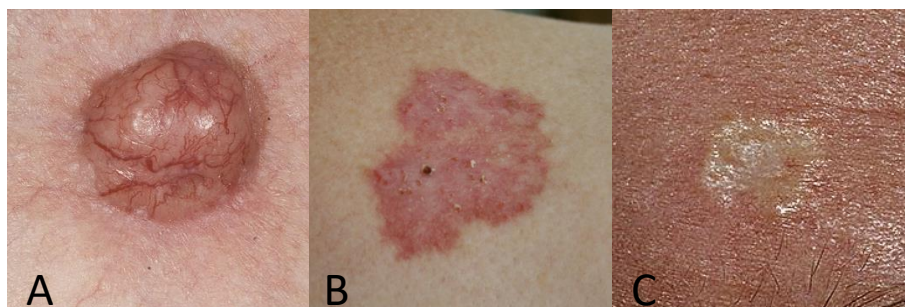


Figura 1.1. Fotografias reais representativas dos principais subtipos de carcinoma basocelular. A) Subtipo Nodular [7]; B) Subtipo Superficial [8]; C) Subtipo Infiltrativo [7].

A nível da distribuição corporal, o CBC encontra-se predominantemente na região da cabeça e pescoço (83-85%) [10] podendo também ser encontrados tumores nas restantes regiões corporais, como o tronco, os membros ou a região genital (figura 1.2). Observando a distribuição corporal destes tumores consoante o seu subtipo, destaca-se o subtipo nodular como sendo o que mais predomina as regiões da cabeça e pescoço (77,4%), membros superiores (56,6%) e inferiores (49,1%) e região genital (57,14%), contudo na região do tronco é o subtipo superficial que se destaca com o valor percentual de 54,4% (figura 1.2) [9]. Desta forma pode dizer-se que o subtipo nodular é mais comum em zonas cronicamente expostas a radiação, enquanto o subtipo superficial aparece principalmente em zonas protegidas e em que a exposição a radiação ocorre de forma intermitente. No que diz respeito à distribuição corporal do CBC entre sexos verificam-se algumas diferenças, no sexo masculino existe uma maior densidade de tumores no couro cabeludo, o que pode ser explicado pela grande incidência de calvície, enquanto no sexo feminino os tumores de CBC aparecem com maior frequência nos membros, quer superiores, quer inferiores, o que pode dever-se ao uso de roupas que permitem a exposição destas regiões à radiação solar [11].

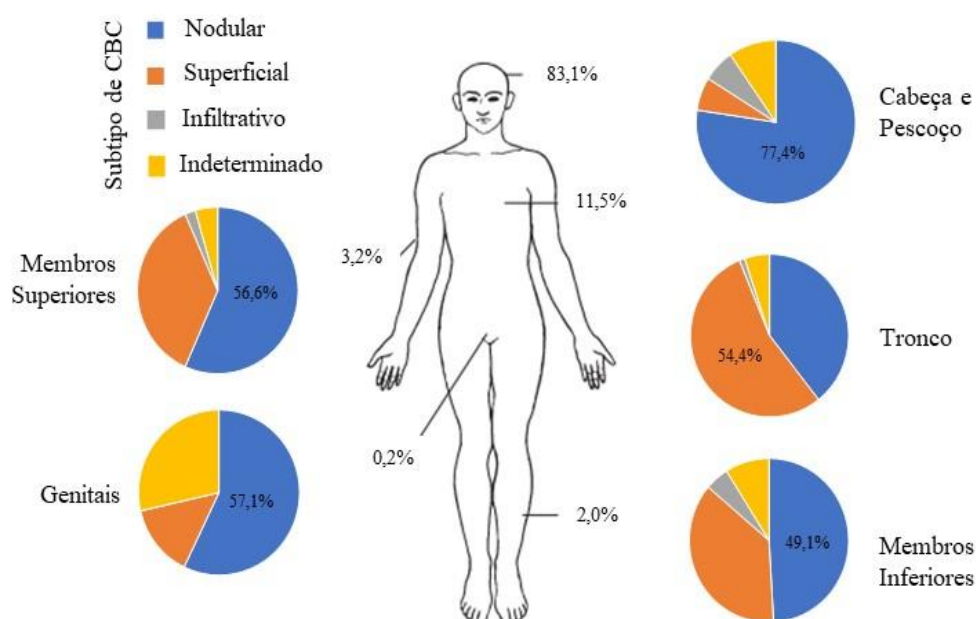


Figura 1.2. Representação esquemática da distribuição corporal do carcinoma basocelular, no geral, e dos 3 subtipos principais identificados (Nodular, Superficial e Infiltrativo). Na imagem representativa do corpo humano são apresentadas as percentagens da distribuição do CBC em geral. Cada gráfico circular corresponde a uma região corporal diferente e representa a distribuição dos 3 principais subtipos de CBC em cada uma dessas regiões, o valor percentual apresentado corresponde sempre ao subtipo de CBC que, em cada região, tem maior incidência. Imagem adaptada de Scrivener et al (2002) [9].

1.2 Epidemiologia

Ao nível epidemiológico, sabe-se que o carcinoma basocelular é o cancro cutâneo mais frequente, aparecendo numa proporção de 5:1 relativamente ao SCC e de 9:1 relativamente ao melanoma [12]. A tabela 1.1 resume alguns valores de incidência do CBC, por sexo, encontrados para diferentes países. Apesar dos estudos terem sido realizados em anos distintos, é possível observar que os valores mais elevados correspondem a países cuja latitude é mais baixa e onde as populações apresentam um fototipo de pele mais baixo, como é o caso da Austrália [6], o que confirma o descrito na literatura. Estudos que acompanham a evolução da incidência de CBC ao longo dos anos descrevem um aumento de cerca de 10% ao ano [10], o que sugere que o carcinoma basocelular se vai tornar o cancro mais comum a curto/médio prazo. Esta evidência poderá tornar-se real pois o CBC apresenta uma taxa de mortalidade praticamente nula [6] e a incidência de metástases ocorre a uma taxa de 0,03% [3], desta forma os doentes com esta patologia têm na sua maioria um tratamento eficaz e, portanto, têm potencial para sobreviver durante muitos anos.

Tabela 1.1. Resumo dos valores de incidência do carcinoma basocelular em vários países do globo. Os valores apresentados encontram-se em número de novos casos por cada 100 000 habitantes por ano. É necessário ter em conta que os valores de incidência apresentados na tabela podem estar subestimados pois, no século passado, nem todos os casos de CBC eram reportados e muitos outros eram mal diagnosticados sendo muitas vezes registados como psoríase, eczema numular ou discoide, entre outras doenças cutâneas [6].

| País | Ano | Incidência | | Referência |
|-----------------------------|------|------------|----------|-----------------------------------|
| | | Homens | Mulheres | |
| Alemanha ^[13] | 1999 | 96 | 95 | Katalinic, A. et al (2003) |
| Austrália ^[14] | 1998 | 2058 | 1195 | Buettner e Raasch (1998) |
| Canadá ^[15] | 2004 | 87 | 68 | Demers, A.A et al (2005) |
| EUA ^[16] | 2001 | 936 | 497 | Harris, R. B. et al (2001) |
| Finlândia ^[17] | 1999 | 49 | 45 | Hannuksela-Svahn, A. et al (1999) |
| Reino Unido ^[18] | 2000 | 128 | 105 | Holme, S.A. et al (2000) |

Relativamente à distribuição de CBC por sexo, o sexo masculino tem uma incidência 20-40% mais elevada que o sexo feminino [6]. Observando os valores apresentados na tabela 1.1 é possível verificar que a incidência apresentada para o sexo masculino é sempre superior à do sexo feminino. Geralmente é diagnosticado após os 40 anos de idade e raramente antes dos 20 anos [2], contudo o aparecimento de CBC nos jovens tem tendência a aumentar devido à maior exposição a radiação solar [3]. A figura 1.3 representa, graficamente, a distribuição por sexo, onde é evidente uma maior incidência no sexo masculino e, secundariamente, a distribuição da incidência de CBC por idades dentro do mesmo sexo, onde se pode observar que as porções correspondentes aos intervalos de idade abaixo dos 40 anos são reduzidas ou mesmo inexistentes.

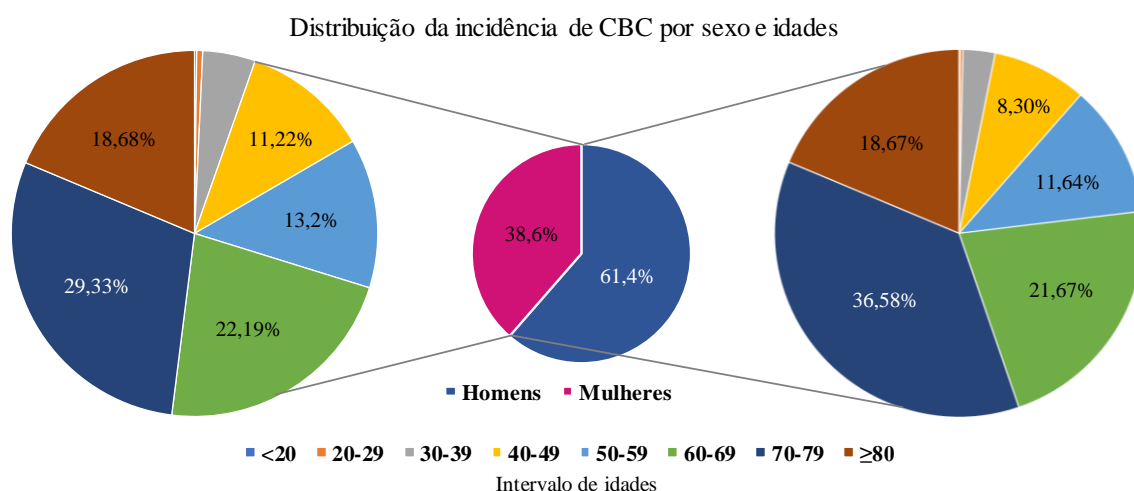


Figura 1.3. Representação gráfica da distribuição por sexo e idade da frequência do carcinoma basocelular. Os valores relativos aos intervalos de idades <20 e 20-29 anos são inferiores a 1% para ambos os sexos e, portanto, a sua representação é praticamente oculta. Os dados representados foram retirados de Harris R. B. et al (2001) [16].

1.3 Fatores de Risco

Todas as patologias têm associados fatores de risco, sejam estes genéticos, ambientais ou sociais, o carcinoma basocelular não é exceção e está também associado a diversos fatores de risco. A exposição a radiação é o principal fator de risco descrito para o CBC. Vários tipos de radiação estão descritos neste contexto, incluindo a radiação solar (da qual a fração ultravioleta parece ser a mais importante) e a radiação ionizante (utilizada em tratamentos de radioterapia). O fototipo (que designa a suscetibilidade da pele à radiação solar), a cor da pele, a cor do cabelo, a existência de danos na pele (ex: cicatrizes) [11], a falta de ingestão de vitaminas, uma dieta rica em gorduras e a exposição a químicos (ex: arsénio, presente em herbicidas) [3, 6] são também considerados fatores de risco.

As primeiras evidências de que a radiação ionizante poderia ser um dos principais fatores que influenciam o aparecimento de CBC resultaram da análise de relatórios de NMSC que apareceram em médicos e técnicos que utilizaram os primeiros dispositivos com radiação [19]. Desde então estudos posteriores vieram mostrar que os mineiros de urânio, os radiologistas, os agricultores e indivíduos cujo trabalho implica longas horas de exposição solar e os doentes tratados com radioterapia têm um risco elevado de vir a desenvolver algum tipo de NMSC, principalmente CBC [20].

Seria interessante conseguir estabelecer uma relação direta entre a exposição a radiação e o risco de vir a desenvolver algum tipo de CBC, contudo essa relação ainda não foi conseguida pois é necessário entrar em conta com outros fatores como o tipo, a quantidade e o comprimento de onda da radiação, o tempo de exposição, o tipo de pele e o local do corpo exposto [2]. No entanto, sabe-se que o fototipo de pele I (pele que tem tendência a queimar e não bronzeia), os olhos claros, o cabelo ruivo ou louro [6], a frequente exposição solar sem proteção contra os raios UV [4] e as queimaduras solares esporádicas durante a infância [3] são fatores que contribuem para aumentar o risco de aparecimento CBC.

Outro fator que influencia consideravelmente o aparecimento de CBC, é a terapia imunossupressora, uma vez que indivíduos recém transplantados têm um risco de desenvolver CBC 10 vezes superior em relação à população em geral, e sabe-se ainda que 16% dos doentes submetidos a transplante renal desenvolvem algum tipo de carcinoma basocelular [2]. Isto deve-se à falta de imunovigilância, ou seja, a terapia imunossupressora, assim como a radiação UV, vai levar ao decréscimo da densidade de células de Langerhans e à inibição de outros tipos de células apresentadoras de antígenos [21], comprometendo desta forma a imunidade com consequente aumento da probabilidade de proliferação de células alteradas, contribuindo assim para a possível gênese de tumores.

A predisposição genética e a história familiar são também um fator importante na gênese e progressão do carcinoma basocelular. Doentes com albinismo (OMIM 203100), xeroderma pigmentosa (OMIM 278760) e síndromes como a de Gorlin-Goltz (OMIM 109400), a síndrome de Rombo (OMIM 180730) e a síndrome Bazex-Dupré-Christol (OMIM 301845) têm maior suscetibilidade para desenvolver CBC [3, 22].

A síndrome de Gorlin-Goltz (OMIM 109400) é uma doença hereditária autossômica dominante que tem como características fenotípicas macrocefalia, anomalias esqueléticas congénitas, calcificação da foice do cérebro, quistos da mandíbula, alterações oculares e múltiplos CBC's (figura 1.4 A) [23]. O gene *PTCH1*, localizado no cromossoma 9q22-q31, é considerado o principal causador desta síndrome, uma vez que é encontrado na maioria dos doentes em deleção ou com mutações de perda de função [24]. O gene *PTCH1* codifica uma proteína com o mesmo nome que tem um papel essencial na via de sinalização *hedgehog* atuando simultaneamente como recetor de ligandos *hedgehog* e como repressor da proteína SMO, que quando está ativa promove a transcrição de fatores de crescimento [25]. Esta via de sinalização está ativa essencialmente durante o processo embrionário e, portanto, uma ativação alterada da via pode contribuir para a gênese de neoplasias como é o caso do CBC [24].

A síndrome de Rombo (OMIM 180730), é caracterizada por hipotricose facial, eritema acral e facial, telangiectasias nas áreas expostas a radiação solar e múltiplos CBC's (figura 1.4 B) [26]. Esta síndrome resulta de uma anomalia autossômica dominante, contudo o cromossoma e os principais genes associados a esta doença ainda não foram descritos. A semelhança das manifestações da síndrome de Rombo com a elastose solar sugerem que a componente genética da síndrome em causa envolve genes reguladores das vias de reparação do DNA ou da regulação do ciclo celular [26], pois estas vias ao estarem alteradas não vão permitir a morte celular ou a reposição das condições de homeostasia e portanto permitem que as células danificadas se mantenham e, consequentemente, apareçam as lesões.

Bazex-Dupré-Christol (OMIM 301845) é uma síndrome hereditária associada ao cromossoma X [24], as principais manifestações fenotípicas são: hipotricose congênita, hipohidrose facial, quistos de mília, atrofodermia folicular das bochechas e dorso das mãos e múltiplos CBC's (figura 1.4 C) [27]. Um estudo com uma família alemã na qual foram avaliados indivíduos com síndrome Bazex-Dupré-Christol (OMIM 301845) em 4 gerações, mostrou, através do estudo de 11 microssatélites marcadores do braço longo do cromossoma X, que a região Xq25-q27.1 é candidata a causadora da síndrome, uma vez que apresentou mutações em todos os indivíduos doentes estudados. [27].



Figura 1.4. Composição de imagens reais representativas das principais síndromes hereditárias que têm como consequência maioritária o aparecimento de múltiplos CBCs [22]. A) Síndrome de Gorlin-Goltz (OMIM 109400) [23]; B) Síndrome de Rombo (OMIM 180730) [26]; C) Síndrome Bazex-Dupré-Christol (OMIM 301845) [27]

1.3.1 *Tinea capitis*

Existe um grupo específico de doentes com carcinoma basocelular que durante a infância sofreram de infecção fúngica do couro cabeludo, mais especificamente dermatofitose ou tinha do couro cabeludo (também conhecida por *tinea capitis*), muito comum no século XX, tendo sido um dos grandes problemas de saúde pública desta era, sobretudo na sua primeira metade. Esta doença deve-se à infecção do couro cabeludo e das hastes pilosas por fungos dermatófitos, sendo o agente causal específico variável consoante diversos fatores epidemiológicos, nomeadamente a região geográfica e o modo de contágio. Clinicamente, a tinha do couro cabeludo manifesta-se sobretudo por uma ou várias áreas de alopecia com fratura dos cabelos (tonsura) associada a graus variáveis de descamação, eritema ou inflamação, podendo condicionar prurido [28].

Até ao início do século passado não existia cura para a tinha do couro cabeludo. Em 1904 foi desenvolvido um tratamento que consistia na epilação por raios-X da região infetada e, julgando-se um tratamento sem quaisquer consequências ou danos, estima-se que mais de 200 000 crianças em todo o mundo tenham recebido este tratamento [29]. No entanto, por volta dos anos 50 a ocorrência de tumores cutâneos aumentou consideravelmente, principalmente de CBC, e com elevada incidência em indivíduos com histórico de radioterapia para *tinea capitis*, o que levou a considerar que a exposição a radiação ionizante, mais concretamente o tratamento por radioterapia para *tinea capitis* é um fator de risco para o desenvolvimento de CBC. No final da década de 50 foi introduzido um agente antifúngico para tratamento por via oral, a griseofulvina [30], que permitiu substituir o tratamento por radioterapia e assim prevenir indiretamente muitos casos de basalioma do couro cabeludo.

Estudos comparativos que estimaram o risco de desenvolvimento de CBC após tratamento por radioterapia mostraram que os doentes submetidos a esta terapêutica tiveram uma maior frequência da neoplasia em relação a indivíduos que não tinham sido submetidos a terapia por radiação [19] e, entre os doentes irradiados, aqueles que foram submetidos ao tratamento em idades mais jovens apresentaram maior risco de desenvolver CBC [20]. Avaliações do risco de aparecimento de CBC em indivíduos com histórico de radioterapia evidenciaram que, a incidência de CBC em crianças tratadas com radiação para *tinea capitis* é 4 vezes maior comparativamente com crianças que foram tratadas sem radiação [31]. Uma vez que o risco de aparecimento de CBC's após tratamento por radiação é superior para os locais

onde foi administrada a radiação, os indivíduos tratados por radioterapia para a tinea do couro cabeludo têm 5 a 6 vezes maior suscetibilidade de desenvolver tumores na cabeça e pescoço [20].

O período de latência entre o tratamento por radiação e o aparecimento de basalioma é maior quando o tratamento é feito em idades mais jovens do que quando é administrado em idades mais avançadas, sendo em média de pelo menos 20 anos [29]. A taxa de recidiva tumoral é também superior em doentes tratados por radioterapia para *tinea capitis* [30], relativamente a doentes com tumores esporádicos.

1.4 Alterações genéticas descritas

Todos os cancros surgem devido à ocorrência de múltiplas mutações numa célula durante o seu ciclo celular, que ao não serem reparadas poderão conferir vantagem seletiva [32, 33] e posteriormente a proliferação das células alteradas poderá originar lesões tumorais. As alterações moleculares que ocorrem podem ser mutações nucleotídicas, variações no número de cópias causadas por inserções ou deleções ou rearranjos equilibrados que afetem a expressão génica [33]. Estas alterações encontradas no genoma das células tumorais devem-se a erros na replicação do DNA, a uma reparação errada do DNA ou devido à exposição a agentes mutagénicos endógenos e exógenos [34], como os radicais livres, os vírus ou a radiação ionizante.

As mutações que estão presentes nos tumores podem ser de dois tipos: *driver* ou *passengers*. As mutações *driver* são as que estão implicadas na oncogénese, ocorrem em oncogenes, genes supressores tumorais e genes de reparação do DNA [35], e conferem uma vantagem seletiva ao nível da proliferação celular. As mutações *passengers* também estão presentes nas células tumorais mas não contribuem, diretamente, para a progressão dos tumores [33], são então mutações neutras [32].

Não é apenas a presença das mutações que leva à génese e progressão dos tumores, as mutações presentes têm de influenciar a expressão dos genes, alterando-a. No caso das mutações silenciosas, a proteína produzida não estará alterada funcionalmente e, portanto, não contribui, diretamente, para a proliferação descontrolada da célula e consequente progressão do tumor. Contudo não são só as alterações na sequência de nucleótidos que afetam a expressão dos genes, as alterações epigenéticas do DNA, como é o caso da metilação de promotores, também afetam o silenciamento e a expressão diferencial dos genes [36]. Desta forma, pode dizer-se que o cancro é o resultado da alteração da função dos genes devido à ocorrência de alterações genéticas e epigenéticas [37, 38].

A metilação é uma modificação química do DNA que influencia o enrolamento da cromatina e consequentemente a expressão dos genes. No genoma de uma célula normal, existem dinucleótidos CpG cuja citocina pode ou não estar metilada [37]. Em algumas regiões do genoma existe uma maior frequência de dinucleótidos CpG, são denominadas ilhas CpG e geralmente encontram-se próximo de promotores de genes, quando estão metiladas levam à repressão da expressão dos genes [39]. Numa célula tumoral vão ocorrer alterações epigenéticas, como a hipermetilação de regiões promotoras de genes supressores tumorais, o que leva ao silenciamento dos genes e consequentemente à desregulação celular.

Uma vez que a carcinogénese de todos os tumores tem origem em alterações genéticas e epigenéticas, e não existem, tanto quanto é do nosso conhecimento, estudos de caracterização molecular do carcinoma basocelular realizados e publicados, o seu estudo pode ser essencial para o diagnóstico, desenvolvimento e seleção de terapêuticas dirigidas ou mesmo para definir um prognóstico e o potencial de metastização [40].

Sabe-se que a via de sinalização *hedgehog* (HH) está ativada indevidamente em casos de CBC, o que pode ser efeito tanto da perda de função da proteína transmembranar PTCH1, com consequente ativação da via, ou efeito de mutações de ganho de função nas proteínas SHH e GLI que permitem que ocorra transcrição de genes envolvidos na proliferação celular. Também já foram encontradas associações a polimorfismos nas famílias da glutatona S-transferase e do citocromo P450s (CYP). O *CYP2D6* e o *GSTT1* estão associados à suscetibilidade de desenvolver CBC enquanto o *CYP2D6* juntamente com o recetor da vitamina D e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estão associados ao aumento do número de tumores [3, 6].

1.4.1 Alterações genéticas induzidas pela radiação

Já há bastante tempo que é sabido que a radiação é um carcinogéneo ambiental universal, uma vez que consegue induzir a formação de tumores em vários tecidos, em várias espécies e em todas as idades [41].

A exposição a qualquer tipo de radiação, seja radiação ionizante, UVA ou UVB, vai levar a uma instabilidade genómica das células expostas, o que leva a que geração após geração surjam múltiplas alterações na sequência de DNA o que por fim pode conduzir à génese de tumores [41, 42]. Os danos ao nível do DNA causados pela radiação são múltiplos, desde mutações pontuais, *cross-linking*, quebras na dupla cadeia de DNA, deleções e formação de dímeros de pirimidinas [32]. A formação de dímeros de pirimidinas, geralmente, ocorre em regiões de pirimidinas em *tandem*, que são reconhecidos como locais *hot spot* para mutações induzidas pela radiação UV, que, em geral, são na forma de transições C>T ou CC>TT e são conhecidas como as “assinaturas” mutacionais da radiação UV [42].

A relação entre a exposição a radiação UV e o aparecimento de cancros cutâneos é bastante complexa [43]. A exposição diária à luz solar implica também exposição a radiação UV, pelo que diariamente as células da pele estão sujeitas a alterações genéticas induzidas pela radiação, contudo, as células humanas têm mecanismos de reparação do DNA que não permitem que células alteradas se dividam. O problema ocorre quando os mecanismos de reparação não funcionam corretamente, o que pode dever-se a mutações em genes essenciais nas vias de reparação, como é o caso do gene *TP53* que se encontra mutado em 40-56% dos tumores de CBC [44], levando a que mutações em oncogenes e genes supressores tumorais permaneçam e haja assim progressão dos tumores.

A radiação ionizante, utilizada como tratamento em várias patologias, afeta de igual forma todos os tecidos, sendo que a severidade dos danos depende de fatores como a dose administrada [41]. Pensa-se que os efeitos deste tipo de radiação na carcinogénese são mediados por espécies reativas de oxigénio e a toxicidade que estas têm para o organismo, ou devido a polimorfismos em genes codificantes de enzimas que degradam as espécies reativas de oxigénio, como as enzimas GSMT1 e GSTT1 [43].

Mizuno *et al* (2006), mostraram que 60% dos tumores de indivíduos expostos a radiação apresentam alterações nos genes *TP53* e *PTCH1* [45]. Especificamente no genoma mitocondrial, um estudo realizado, em 2014, por Boaventura *et al*, revelou uma maior instabilidade na região D310 do loop-D em indivíduos com CBC que anteriormente tinham sido tratados com radiação relativamente a indivíduos que não foram submetidos ao tratamento [46]. Devido à elevada prevalência de cancros cutâneos na população humana, Armstrong e Kricker (2001) concluíram que a exposição a radiação UVB leva ao aparecimento de mutações no gene *TP53* e no gene *INK4A* [11], o que consequentemente pode levar ao aparecimento de CBC uma vez que estes genes são supressores tumorais.

1.5 Tratamento

O CBC é um tipo de tumor cutâneo que apresenta uma taxa de mortalidade praticamente nula, o que se deve essencialmente ao seu potencial maligno quase exclusivamente local caracterizado por capacidade de invasão dos tecidos adjacentes, mas com uma tendência mínima para metastização, o que faz com que os tratamentos aplicados sejam curativos numa elevada percentagem dos casos.

O tratamento dos CBC's pode ser feito de diversas formas: excisão cirúrgica convencional, cirurgia micrográfica de Mohs, criocirurgia, curetagem e electrocoagulação, terapia fotodinâmica, radioterapia, terapias tópicas e drogas orais. A seleção do tratamento mais adequado a cada doente e a cada tipo de tumor deve ser cuidada e ter em conta fatores como o tamanho do tumor, a localização, a definição das margens, o padrão de crescimento, o subtipo histológico, a ocorrência de metástases e outros tratamentos que estejam a ocorrer em paralelo, assim como as instalações do local e a experiência do corpo clínico [3].

A excisão cirúrgica convencional é o tratamento mais utilizado em casos de carcinoma basocelular, uma vez que, para além de ser uma técnica simples, apresenta uma taxa de cura 5 anos após tratamento superior a 95% [6].

A cirurgia micrográfica de Mohs é o tratamento mais adequado para tumores localizados em áreas de risco, como a face, para tumores do tipo infiltrativo e para tumores recorrentes, e apresenta uma taxa de cura 5 anos após tratamento de 95-99% [3, 6]. Em contrapartida, o tratamento por curetagem com eletrocoagulação não é aconselhado a tumores em áreas de risco ou do tipo infiltrativo [6]. Para tumores do tipo superficial é aconselhada a terapia fotodinâmica uma vez que esta terapêutica permite uma taxa de remoção do tumor de 87% sem posteriores cicatrizes [2, 3].

Apesar de estar descrito na literatura que a exposição a radiação aumenta o risco de desenvolver CBC, a radioterapia é também um tratamento possível para este tipo de tumores cutâneos, sendo geralmente aplicada em casos de doentes idosos com lesões extensas e nas quais o tratamento por excisão cirúrgica não é apropriado [6]. Apresenta uma taxa de cura após 5 anos de cerca de 90% [47].

Vismodegib é o fármaco mais recente para o tratamento de carcinoma basocelular e tem a capacidade de inibir a via de sinalização *hedgehog*, que se encontra anormalmente ativada em mais de 80% dos CBC's, ao inibir a proteína transmembranar SMO. Esta terapêutica é utilizada maioritariamente em tumores avançados e tumores metastáticos, apresentando taxas de resposta nas ordens dos 60% e 50%, respetivamente [48].

1.6 Técnicas Laboratoriais

O estudo do DNA pode ser realizado recorrendo a várias técnicas moleculares e de microscopia como a citogenética convencional, a FISH, o MLPA ou o array-CGH. Neste trabalho foram utilizadas as técnicas de array-CGH 180K e MS-MLPA para o estudo genómico, e posterior identificação de biomarcadores, de amostras de carcinoma basocelular. As vantagens e as desvantagens das técnicas encontram-se descritas abaixo.

1.6.1 Array-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH)

O array-CGH é uma técnica quantitativa que permite detetar variações no número de cópias ao longo de todo o genoma e com elevada resolução [49], ou seja, permite identificar segmentos de DNA de tamanho variável que estão presentes num número variável de cópias em comparação com um genoma referência ou controlo [50].

Na técnica de array-CGH são utilizadas sondas sintéticas de oligonucleótidos, complementares a regiões específicas do DNA humano, que estão dispostas aleatoriamente numa lâmina de array. No array-CGH 180K são analisadas 180 000 sondas de oligonucleótidos podendo ser analisadas 4 amostras diferentes em cada lâmina. A quantidade de sondas presentes vai influenciar a resolução e a sensibilidade da técnica, quanto maior o número de sondas maior a resolução e, portanto, alterações mais pequenas serão detetadas [51].

Previamente, tem de ser realizada a extração do DNA das amostras seguida de quantificação do mesmo, este passo é essencial pois é necessária uma concentração mínima de DNA (500ng) para que se possa realizar a técnica de array-CGH.

Neste método, o DNA da amostra e o DNA da referência (DNA sem alterações) são marcados com fluorocromos [52] e posteriormente co-hibridizados na lâmina de array [53]. O DNA da amostra em estudo é marcado com o fluorocromo Cyanine 5 (Cy5), que emite fluorescência vermelha, e o DNA da amostra referência é marcado com fluorocromo Cyanine 3 (Cy3), que emite fluorescência verde (figura 1.5) [54, 55]. As duas amostras marcadas ao serem co-hibridizadas na lâmina de array, vão ligar-se aos oligonucleótidos e permitir que através de um scan de microarrays seja lida a fluorescência associada a cada ponto de sondas e assim obter resultados relativos ao número de cópias de cada região.

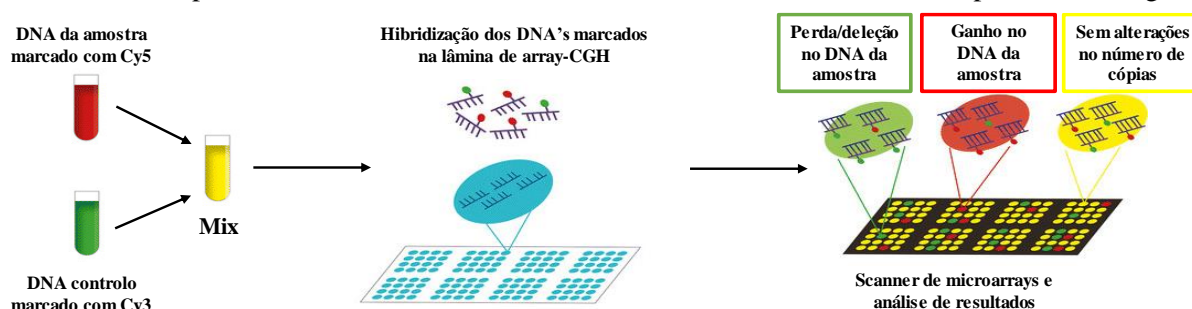


Figura 1.5. Representação esquemática das principais etapas da técnica de array-CGH: marcação do DNA em estudo com o fluorocromo Cy5 e do DNA controlo com o fluorocromo Cy3, mistura dos dois DNA's, co-hibridização dos DNA's com as sondas de oligonucleótidos na lâmina de array, deteção da fluorescência através de um scan de microarrays e análise dos resultados. Imagem adaptada de Colaianni et al, 2016 [53].

O rácio de fluorescência obtido para cada ponto de sondas vai determinar se existe uma amplificação ou uma deleção no DNA. Se o \log_2 do rácio de fluorescências estiver próximo de -1 é indicativo que está presente uma deleção em heterozigotia, ou seja, apenas existe uma cópia, no DNA da amostra em estudo, e a cor obtida pelo scanner de microarrays é mais próxima à fluorescência do DNA controlo (verde). Se o \log_2 do rácio de fluorescências se apresentar próximo de 0,58 é indicativo que está presente uma cópia extra, ou seja, o DNA da amostra em estudo apresenta 3 cópias para a região em questão, no scanner de microarrays a cor obtida estará mais próxima da fluorescência com que foi marcada a amostra em estudo (vermelho). Por fim, se o \log_2 do rácio de fluorescências obtido estiver em redor de 0 é indicativo que não existem variações no número de cópias, ou seja, o número de cópias presente no DNA controlo é igual ao número de cópias presente no DNA em estudo, desta forma a fluorescência detetada pelo scanner é uma junção dos dois fluorocromos o que vai originar uma cor próxima do amarelo (vermelho + verde) [56].

O array-CGH é uma técnica que traz vantagens para o estudo do genoma, uma vez que não é necessário estabelecer cultura celular para realizar a técnica e em apenas uma reação se pode estudar todo o genoma, os resultados obtidos permitem identificar variações no número de cópias, sendo que como a técnica tem uma resolução superior à citogenética convencional, que apresenta uma resolução de 3-5Mb, permite identificar anomalias cromossómicas submicroscópicas que outras técnicas não têm capacidade [51]. Por oposição, esta técnica não permite detetar rearranjos equilibrados, como

translocações e inversões, não permite detetar mosaicismo de baixa expressão (<20%) [57], mutações pontuais e dissomias uniparentais, tem ainda a desvantagem de ser dispendiosa [58]. É de notar que a relação genótipo-fenótipo será útil para o diagnóstico e investigação, mas apenas se houver uma boa história clínica que permita a interpretação dos resultados encontrados [59].

1.6.2 Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA)

O MS-MLPA é uma técnica que deriva do MLPA. É um método baseado no PCR multiplex [36], permite detetar variações no número de cópias assim como alterações no padrão de metilação em ilhas CpG [40].

Nesta técnica são utilizadas sondas de oligonucleótidos que vão hibridizar com regiões muito específicas do genoma, cada sonda de MS-MLPA é formada por duas hemi-sondas que hibridizam em regiões adjacentes na molécula de DNA e que numa fase posterior da técnica são ligadas formando então uma única sonda. Uma das hemi-sondas, é formada por um oligonucleótido sintético que contém uma sequência de hibridização específica de cerca de 21 a 30 nucleótidos no terminal 3' e no terminal 5' possui uma sequência de 19 nucleótidos que é comum a todas as hemi-sondas sintéticas e será a região reconhecida pelo *primer*. A segunda hemi-sonda deriva de um vetor vírico e contém uma sequência de hibridização de 25 a 43 nucleótidos no terminal 5', uma sequência *stuffer* que não hibridiza com o DNA e permite a cada sonda ter um comprimento diferente, e uma sequência de 36 nucleótidos no terminal 3' que são comuns a todas as sondas e serão complementares com o *primer* (figura 1.6) [36, 60]. Por serem sondas de MS-MLPA têm a particularidade de as suas sequências alvo serem específicas para regiões que contêm um local de restrição para a enzima sensível a metilação [40].

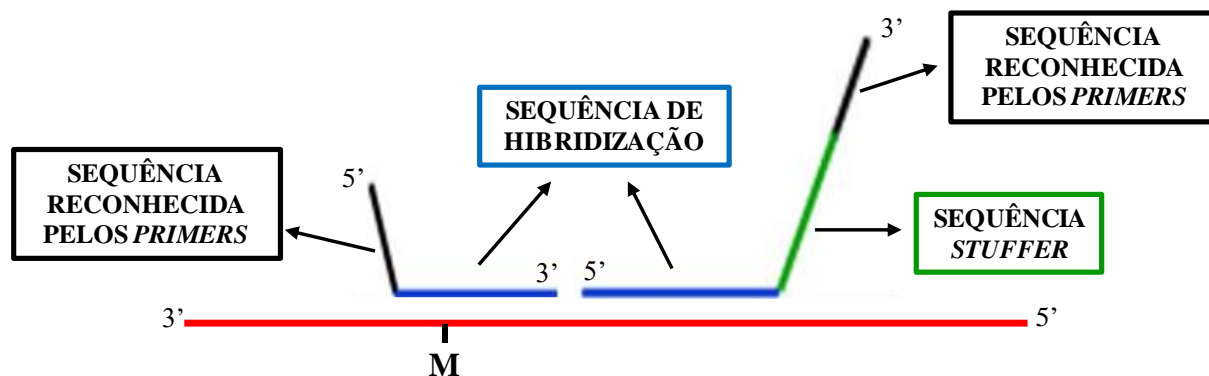


Figura 1.6. Representação esquemática das hemi-sondas de MS-MLPA. A vermelho está representada a sequência de DNA da amostra em estudo, estando ainda representado um local de metilação, uma vez que as sondas de MS-MLPA hibridizam em ilhas CpG. Imagem adaptada de Homig-Holzel, C. and S. Savola, 2012 [36].

Apesar de ser um método baseado na técnica de PCR multiplex, o MS-MLPA não amplifica o DNA em estudo, mas sim as sondas que com ele hibridizam, e para tal apenas é necessário um único par de *primers* e não um par por cada sonda como acontece no PCR multiplex convencional [36].

Após a hibridização das hemi-sondas com o DNA estas vão ser ligadas com auxílio de uma ligase, esta ligação só ocorre se as duas hemi-sondas hibridizaram com o DNA. Se estivesse perante a técnica de MLPA, as sondas ligadas seguiam já para uma reação de PCR multiplex, no entanto na técnica de MS-MLPA após a ligação das sondas a reação é dividida em duas partes e uma delas é sujeita à ação de uma enzima de restrição sensível a metilação, como a HhaI (figura 1.7) [36]. Com a ação da enzima de restrição, as sondas ligadas que hibridizaram com alelos metilados vão manter-se integras e serão amplificadas, as sondas ligadas que hibridizaram com alelos não metilados vão ser quebradas e portanto já não serão obtidos produtos de amplificação relativos àquela sonda e àquela região do DNA [40].



Figura 1.7. Representação esquemática das 4 principais etapas da técnica de MS-MLPA. 1 - Desnaturação do DNA da amostra; 2 - Hibridização das hemi-sondas com o DNA da amostra durante 16H; 3A - Ligação das duas hemi-sondas com auxílio de uma enzima ligase; 3B - Ligação das duas hemi-sondas com auxílio de uma enzima ligase e posterior digestão por ação de uma enzima de restrição sensível a metilação; 4 - Amplificação por PCR das sondas ligadas e não digeridas. Na representação das sondas, a azul está representada a sequência de hibridização, a verde a sequência stuffer e a preto o local de ligação aos primers. Imagem adaptada do protocolo MRC-Holland, 2016 [62].

Após a amplificação por PCR das sondas ligadas, e devido à existência de uma sequência *stuffer* de comprimento diferente entre sondas, é possível analisar de uma forma semiquantitativa, por comparação com amostras referência, os produtos de amplificação através de eletroforese capilar [36]. Em cada reação de MS-MLPA para além das amostras em estudo entram também 3 amostras controlo e um controlo negativo (água) que servem não só para a comparação de resultados mas também para controlo da técnica [61], isto é, se houver dificuldades na desnaturação do DNA ou na hibridização das sondas isso vai influenciar de igual forma as amostras em estudo e as amostras referência, assim será mais fácil detetar e eliminar erros de técnica.

Os painéis de sondas de MLPA/ MS-MLPA podem conter até 50 sondas diferentes que reconhecem sequências alvo com até 100 nucleótidos de comprimento, o que permite que a técnica possa ser utilizada em amostras de DNA fragmentado [36]. Em cada painel de sondas de MS-MLPA existem algumas sondas que servem de controlo uma vez que vão hibridizar em locais do genoma que não se esperam alterados [36] e, portanto, deverão apresentar o mesmo sinal entre as várias amostras permitindo a comparação dos resultados entre amostras. Quando são analisadas amostras tumorais, geralmente os painéis de sondas utilizados tem um maior número de sondas controlo e estas vão hibridizar em regiões cromossómicas onde não estão oncogenes ou genes supressores tumorais [36].

A técnica de MS-MLPA apresenta várias vantagens relativamente a outras técnicas de deteção de variações no número de cópias de genes e de deteção de alterações no padrão de metilação dos genes. O MS-MLPA permite detetar deleções e amplificações num único exão, permite detetar mutações pontuais, permite analisar 50 locais diferentes no genoma e apenas são necessárias 20ng de DNA para realizar esta técnica. Tem ainda vantagens na realização, é fácil de executar, permite obter resultados em 24 horas e tem custos relativamente baixos devido à possibilidade de ser utilizado apenas um par de *primers* e apenas ser necessário um termociclador *standard* e um analisador genético [36, 40, 60].

O MS-MLPA também apresenta algumas limitações como: não possibilita o estudo de todo o genoma com apenas uma reação, não permite detetar rearranjos equilibrados e as sondas são restritas para locais GCGC reconhecidos pela enzima de restrição sensível a metilação [36].

2 Objetivos

Uma vez que, atualmente, não existem, tanto quanto é do nosso conhecimento, estudos relativos ao padrão de metilação e à caracterização genómica do carcinoma basocelular, é importante fazer esforços no sentido de encontrar alterações genómicas e epigenéticas no carcinoma basocelular para que

seja feita uma caracterização molecular da doença, o que poderá auxiliar estudos futuros ou diagnósticos moleculares e, consequentemente, estabelecer melhor prognósticos e tratamentos.

Desta forma, o principal objetivo do estudo consiste na caracterização do ponto de vista genómico e epigenético de carcinomas basocelulares (CBC's) do couro cabeludo de doentes com história de radioterapia para *tinea capitis* em comparação com CBC's de áreas cronicamente expostas à radiação ultravioleta de doentes não irradiados. Os objetivos específicos do estudo passam por: 1) identificar padrões de alterações moleculares entre os doentes com CBC e histórico de radioterapia; 2) identificar padrões de alterações moleculares entre os doentes com CBC's esporádicos; 3) identificar alterações moleculares comuns e distintas entre os dois grupos de doentes em estudo.

A caracterização será feita pelas técnicas de array-CGH e MS-MLPA de forma a identificar variações no número de cópias e alterações no padrão de metilação em carcinomas basocelulares, tendo como amostras controlo biópsias cutâneas de indivíduos que visitam o Serviço de Dermatologia do CHUC mas que não apresentam história clínica de cancro.

3 Materiais e Métodos

3.1 Seleção e colheita de amostras

O conjunto de amostras estudadas proveio do Serviço de Dermatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e inclui, de cada doente, tecido tumoral e tecido não tumoral, colhido das margens adjacentes ao tumor e considerado tecido macroscopicamente livre de tumor. Todas as amostras são de origem cutânea e foram obtidas por excisão e/ou biópsia seguida de exame histopatológico, sempre pelo mesmo clínico. Foram também utilizadas amostras controlo provenientes de indivíduos sem história clínica de cancro e que visitam o mesmo serviço devido a outras patologias dermatológicas. As amostras foram colhidas no período entre janeiro de 2017 e março de 2018.

As amostras tumorais estudadas foram divididas em dois grupos: 1) amostras de doentes com carcinoma basocelular do couro cabeludo e simultaneamente histórico de radioterapia para *tinea capitis* durante a infância; 2) amostras de doentes com carcinoma basocelular esporádico com aparecimento em áreas cronicamente expostas à radiação ultravioleta (ex.: face). A tabela 3.1 resume as principais características de cada grupo de amostras estudado, tais como número de amostras, intervalo de idades e sexo.

Tabela 3.1. Caracterização do conjunto de amostras estudado.

| Grupo | Pós-radioterapia | Esporádicos | Controlo |
|----------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------|
| Nº amostras | 14 | 14 | 8 |
| Sexo Masculino (nº) | 5 | 6 | 3 |
| Sexo Feminino (nº) | 9 | 8 | 5 |
| Intervalo de idades | 62-81 | 57-87 | 18-67 |

Todos os indivíduos participantes neste projeto foram devidamente informados sobre o mesmo e consentiram a utilização das suas amostras para estudo de acordo com a regulamentação da Declaração de Helsínquia. O estudo foi aprovado pelo Comité de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

3.2 Extração e quantificação de DNA

O DNA, quer das amostras dos doentes quer das amostras controlo, foi extraído utilizando o High Pure PCR Template Preparation kit (Roche GmbH, Mannheim, Germany) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. [62].

A determinação da concentração e pureza dos DNA's extraídos foi realizada por espectrofotometria de UV utilizando um Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

3.3 Estudo Genómico

O estudo por array-CGH foi realizado usando a plataforma Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray 180 K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) [63], em que cada microarray contem 180 000 sondas 60-mer. A marcação foi realizada com o Sure Tag Complete DNA Labeling Kit (Agilent Technologies, USA) [64], durante o qual as amostras tumorais foram marcadas com o fluorocromo Cy5 (fluorescência vermelha) e as amostras controlo com o fluorocromo Cy3 (fluorescência verde). Para cada amostra estudada foi selecionado e marcado um DNA controlo tendo em conta o sexo do doente em estudo. Após a co-hibridização foi avaliada a fluorescência num Agilent scanner. Os resultados obtidos por scan foram processados com o software Feature Extraction (v10.7.3.1) (Agilent Technologies) e posteriormente analisados usando o software Agilent Genomic Workbench (v6.5) (Agilent Technologies). Os resultados tiveram em conta a construção do Genoma Humano 19 e os desequilíbrios com pelo menos três sondas consecutivas com valores logarítmicos irregulares foram consideradas variações no número de cópias.

3.4 Estudo Epigenético

O estudo por MS-MLPA [65] foi realizado usando o painel de sondas ME002 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) [66], que permite, simultaneamente, o estudo do padrão de metilação de 25 promotores de genes supressores tumorais, através de 27 sondas de MS-MLPA, e a deteção de variações no número de cópias em 38 genes supressores tumorais, através de 41 sondas [66]. A técnica foi executada segundo o protocolo do fabricante, para cada reação foram usadas 3 amostras controlo e água como controlo negativo e a hibridização foi realizada durante 15-16h num termociclador (ABI 2720, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os produtos de amplificação obtidos foram separados por eletroforese capilar, realizada no analisador genético (Gene Scan ABI PRISM 3130, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), e os resultados obtidos foram processados pelo software GeneMapper (v4.1) e analisados com auxílio do software Coffalyser.NET. Quando os valores para o número de cópias foram inferiores a 0,8 considerou-se uma perda para o gene em estudo e quando os valores foram superiores a 1,2 considerou-se um ganho. Relativamente ao padrão de metilação, quando foram identificados valores de metilação iguais ou superiores a 20% o gene foi considerado metilado.

4 Resultados e Discussão

A apresentação e análise dos resultados está dividida por grupo de doentes. Foram estudados dois grupos de doentes tendo em conta o principal fator de risco do carcinoma basocelular: a exposição a radiação. Dentro de cada grupo foi feita uma breve caracterização do mesmo, seguindo-se a apresentação e discussão dos resultados obtidos pela técnica de array-CGH e posteriormente pela técnica de MS-MLPA, por fim foi feita uma comparação dos resultados obtidos pelas duas técnicas e evidenciadas as conclusões. No final de apresentados os resultados por grupo de doentes foi feita uma comparação dos mesmos entre grupos e retiradas as conclusões finais, tendo sempre como propósito cumprir o principal objetivo do trabalho: caracterizar o carcinoma basocelular genómica e epigeneticamente.

4.1 Grupo doentes com histórico de radioterapia

4.1.1 Caracterização do grupo

O primeiro grupo de doentes estudado trata-se de um conjunto de 14 doentes que apresentam histórico de radioterapia, 13 destes doentes foram tratados com radioterapia para a tinea do couro cabeludo (*tinea capitis*) durante a infância, enquanto 1 doente apresenta histórico de radioterapia para tratamento de linfoma.

Os doentes deste grupo têm idades entre os 62 e os 81 anos, sendo a média de 70,14 anos de idade. Relativamente à distribuição por sexo, 9 dos 14 doentes são do sexo feminino (64%) e os restantes 5 do sexo masculino (36%). Os dados relativos à idade dos doentes deste grupo de amostras apresentam-se de acordo com a literatura, uma vez que o intervalo de idades com maior incidência é entre os 70 e os 79 anos e a média de idades obtida se encontra dentro do intervalo, contudo relativamente ao sexo há mais doentes mulheres, o que não seria de esperar uma vez que na literatura está descrita uma maior incidência no sexo masculino [16].

De cada doente que aceitou participar no estudo e foi inserido neste grupo, foi colhida uma amostra do tumor e uma amostra não tumoral colhida do tecido adjacente à margem do tumor e que se mostra macroscopicamente livre de tumor. Todas as amostras foram colhidas de carcinomas basocelulares do couro cabeludo à exceção de uma que foi colhida de um CBC do tórax (doente tratado para linfoma).

4.1.2 Resultados array-CGH

Pela técnica de array-CGH apenas as amostras tumorais foram estudadas, uma vez que a técnica é dispendiosa e a caracterização pretendida é do genoma das células tumorais.

Os resultados obtidos pela técnica de array-CGH permitiram encontrar variações no número de cópias ao longo de todo o genoma e identificar regiões alteradas em todos os cromossomas, quer autossomas quer cromossomas sexuais, à exceção do cromossoma 21. A distribuição das alterações encontradas encontra-se representada, por amostra, no idiograma da figura 4.1.

Em geral, foram encontradas um total de 319 alterações, o que corresponde a uma média de aproximadamente 23 alterações por amostra, estando distribuídas 220 (69%) alterações nas amostras do sexo feminino e 99 (31%) nas amostras do sexo masculino. Analisando os resultados ao nível do tipo de alteração encontrada, no geral do grupo, 57% das alterações foram perdas no número de cópias e 43% foram ganhos, contudo se esta análise for feita por sexo, nas mulheres foram identificadas 127 perdas (58%) e 93 ganhos (42%) enquanto nos homens aparecem os valores de 55% e 45% para perdas e ganhos no número de cópias, respetivamente.

Cada amostra estudada apresentou um conjunto de alterações distinto quer em localização quer em número, no entanto foi notório o reduzido número de alterações encontradas na amostra proveniente do doente tratado com radioterapia para linfoma (CBC IT), o que pode dever-se à localização do tumor no doente. O couro cabeludo é uma região com maior exposição à radiação solar do que o tórax, desta forma, as alterações encontradas nas amostras colhidas do couro cabeludo poderão dever-se, em parte, à exposição à radiação solar, enquanto as alterações encontradas na amostra colhida do tórax serão mais restritas à exposição à radiação ionizante. Por outro lado, os resultados obtidos podem ainda estar relacionados com o tempo passado entre o tratamento por radioterapia e o diagnóstico do tumor, os doentes tratados para a tinea do couro cabeludo receberam radioterapia na infância e, geralmente, apresentam em média um período de latência superior a 45 anos [29] enquanto o doente tratado para o linfoma terá sido exposto à radioterapia mais tarde, e portanto o período de latência é menor. Sendo o

período de latência menor, o número de divisões celulares é menor e desta forma a quantidade de alterações genéticas que ocorrem e permanecem nas células é também menor.

Ao observar e analisar os resultados obtidos pela técnica de array-CGH verificámos algumas regiões cromossómicas que se salientaram por estarem alteradas em várias amostras. Uma vez que era necessário seleccionar algumas dessas regiões para que fosse feito um estudo dos genes presentes e da sua relação com o desenvolvimento do carcinoma basocelular, o critério utilizado foi a presença da alteração em pelo menos 5 das 14 amostras estudadas, o que corresponde a 31,75% das amostras do grupo. Depois de escolhido o critério, foram identificadas, entre autossomas e cromossomas sexuais, as 17 regiões cromossómicas que se seguem: 3q26.1; 4q13.2; 5q11.1; 8p11.22; 9q21.11-q22.33; 16p11.2-p11.1; 17q21.31; Xq21.1, em perda no número de cópias; 2q37.3; 6p25.3; 9p21.3; 12p13.31; 14q32.33; 15q11.2; 15q26.1; Xp22.33; Yp11.32, em ganho no número de cópias.

De forma a conseguir reduzir os dados obtidos para cada uma das 17 regiões seleccionadas, foram encontrados os valores mínimos e comuns entre as amostras para os seguintes elementos: início, fim e tamanho da alteração e número e nome dos genes descritos para a região alterada, os resultados obtidos encontram-se organizados na tabela A dos anexos.

Das 17 regiões alteradas estudadas, 7 não apresentam genes descritos e das restantes 10 regiões salientam-se os genes *DUSP22*, *FOXC1*, *PGM5*, *PRKACG*, *FXN*, *SMC5*, *KLF9*, *ANXA1*, *PCSKS*, *RFK*, *PRUNE2*, *FOXB2*, *GNAQ*, *CEP78*, *FRMD3*, *KIF27*, *RMI1*, *NAA35*, *GAS1*, *SPIN1*, *CKS2*, *SEMA4D*, *GADD45G*, *OGN*, *BICD2*, *FGD3*, *FANCC*, *PTCH1*, *PPP2R3B* e *SHOX* como sendo os que possivelmente podem estar implicados na origem dos tumores de carcinoma basocelular em doentes com histórico de radioterapia, uma vez que apresentam funções celulares relacionadas com os principais *hallmarks* do cancro.

DUSP22 (6p25.3) é um gene pertencente à família de fosfatases DSP, que têm a capacidade de fosforilar resíduos de tirosina e de treonina [67]. As proteínas da família DSP regulam várias vias de sinalização mediadas por MAPK (cinases de serina/treonina envolvidas na regulação do crescimento celular e da homeostasia em resposta a estímulos exteriores). Em particular, a proteína *DUSP22*, celularmente, encontra-se ancorada à membrana plasmática e desempenha funções na ativação da cinase JNK, um mediador pró-inflamatório e pró-apoptótico envolvido em processos biológicos como a proliferação e diferenciação celulares e a apoptose, e na desativação do recetor de estrogénio alfa (RE- α), um fator de transcrição regulado por fosforilação [68]. Quando o gene *DUSP22* se encontra deletado ou inativo epigeneticamente, a cinase JNK não é ativada e o RE- α mantém-se ativo, pois não é desfosforilado pela *DUSP22*, assim as vias de sinalização que ativam a maquinaria de proliferação e diferenciação celulares mantêm-se ativas, o que contribui para a oncogénese. O gene *DUSP22* já foi encontrado deletado em cancro da mama e cancro do pulmão e amplificado em células B de doentes com LLC (leucemia linfocítica crónica) [67, 69].

O gene *FOXC1* (6p25.3) codifica um fator de transcrição descrito na literatura como responsável pelo desenvolvimento dos olhos e das meninges, uma vez que é um dos genes primários associados à Síndrome de Axenfeld-Rieger (OMIM 602482), que tem como principais consequências malformações na face. Contudo, a sobre-expressão deste gene já foi encontrada em tumores de carcinoma hepatocelular e de cancro da mama do subtipo basal, o que leva a querer que o gene desempenha funções que, quando alteradas, poderão levar à génese de tumores [70]. Estudos feitos em amostras de cancro da mama do subtipo basal mostraram que a sobre-expressão do gene *FOXC1* leva ao aumento da expressão do gene *MMP7*, e consequentemente à síntese de uma quantidade alterada de metaloproteinase 7, que desempenha funções na degradação dos componentes da matriz extracelular, e à ativação da via de sinalização NF-kB, que está envolvida na regulação da resposta imunitária, do ciclo celular e da

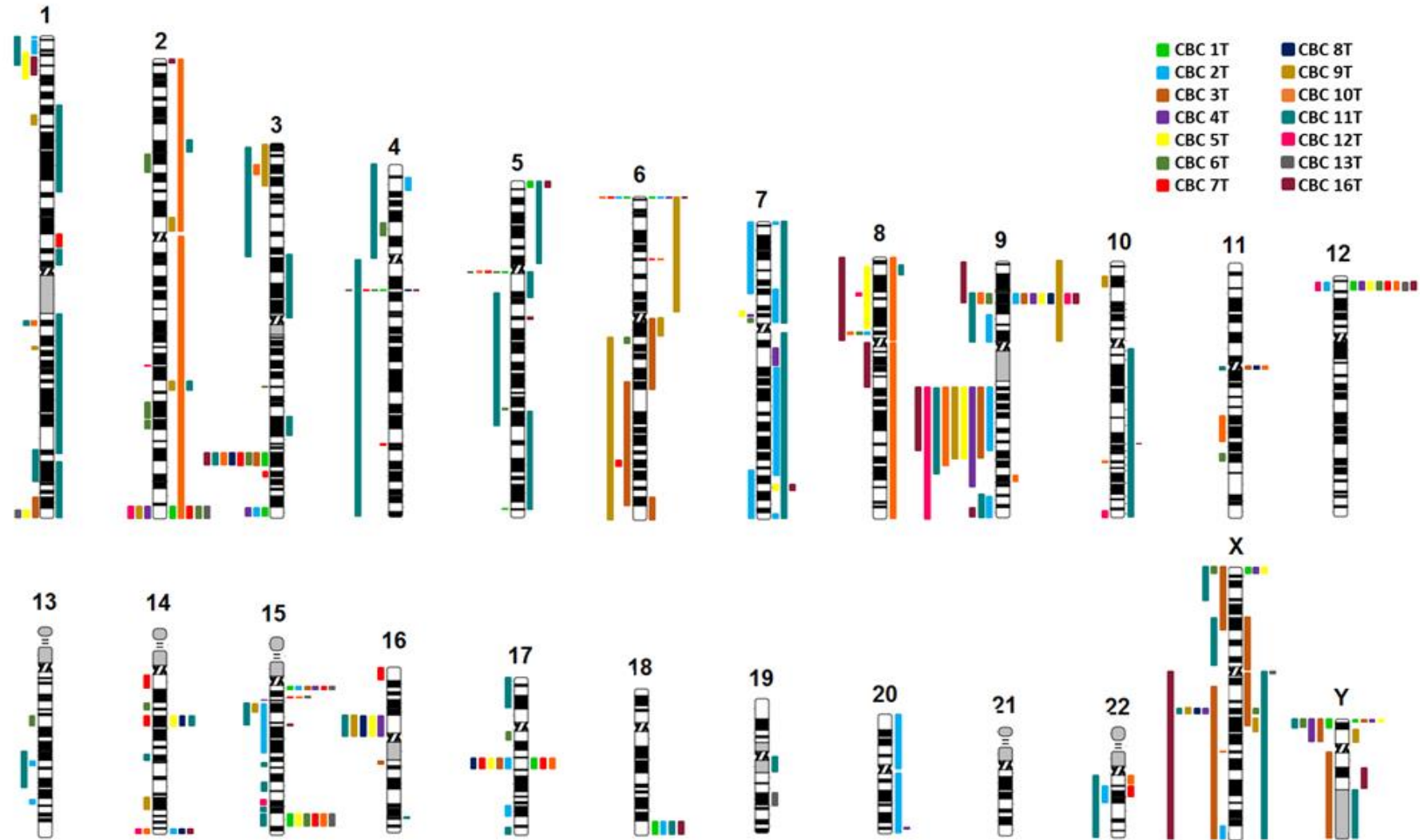


Figura 4.1. Idiograma representativo das alterações encontradas, pela técnica de array-CGH, nas amostras tumorais de carcinoma basocelular de doentes com histórico de radioterapia. Cada cor representada corresponde a um dos 14 doentes estudados. À esquerda dos cromossomas estão representadas as perdas no número de cópias na posição correspondente, enquanto à direita do cromossoma estão representados os devidos ganhos no número de cópias.

sobrevivência celular [70, 71]. Desta forma, pode concluir-se que a sobre-expressão do gene *FOXC1* leva, indiretamente, ao aumento da proliferação, da migração e invasão celular e à sobrevivência das células, o que de certa forma contribui para a carcinogénese. Uma vez que neste trabalho o número de cópias do gene foi encontrado em ganho, é possível inferir que o gene *FOXC1* poderá estar implicado no desenvolvimento dos tumores de carcinoma basocelular em doentes com histórico de radioterapia.

A região 9q21.11-q22.33 está estabelecida como sendo uma região genomicamente associada a cancro, uma vez que a perda de heterozigotia desta região é um fator de risco para o carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (HNSCC), 37% dos HNSCC pré-malignos e 67% dos HNSCC malignos apresentam perda de heterozigotia da região 9q21.1-q22.3 [72]. A elevada frequência da perda da região, não só em HNSCC mas também em cancro da mama, da próstata, do endométrio, do rim, cancro gástrico, coloretal, glioma, neuroblastoma e colangiocarcinoma intra-hepático, indica que estão presentes genes candidatos a supressores tumorais, contudo poucos foram identificados como tal [73]. O gene *PTCH1* está inserido na região 9q21.11-q22.33 e já foi descrito como gene supressor tumoral, apresentando-se comumente deletado em indivíduos com síndrome de Gorlin-Goltz (OMIM 109400) [24]. Dos restantes genes desta região, destacam-se os genes *PRKACG*, *SMC5*, *KLF9*, *CEP78*, *RM11*, *GAS1*, *SPIN1* e *CKS2* ao desempenharem funções na regulação do ciclo celular e proliferação; os genes *PCSK5*, *FOX2*, *GNAQ*, *SEMA4D* e *OGN* como estando envolvidos no crescimento e diferenciação celulares; os genes *FXN*, *ANXA1*, *RFK*, *PRUNE2*, *NAA35* e *GADD45G* como tendo funções na regulação da apoptose; o gene *FANCC* por ser importante no processo de reparação de danos no DNA; os genes *PGM5*, *FRMD3*, *KIF27*, *BICD2* e *FGD3* por estarem associados à regulação do citoesqueleto e mobilidade intracelular (ensemble genes).

O gene *PTCH1* é descrito na literatura como o principal gene responsável pelo carcinoma basocelular, uma vez que é o gene associado à Síndrome de Gorlin-Goltz (OMIM 109400) que tem como uma das manifestações o aparecimento de múltiplos CBC's [22]. Este gene codifica uma glicoproteína com 12 domínios transmembranares, a PTCH1, que desempenha funções de reguladora da via de sinalização *hedgehog* ao servir de recetor de ligandos *hedgehog* (SHH, IHH ou DHH) e simultaneamente de repressora da proteína transmembranar SMO, também participante na via de sinalização [25]. Apresenta funções de repressão da proteína SMO e capacidade de supressor tumoral [74], pois impede que a via de sinalização HH seja indevidamente ativada, o que levaria a que as maquinarias de proliferação e diferenciação celulares fossem ativadas e consequentemente o processo carcinogénico iniciado. Perda no número de cópias do gene *PTCH1* ou mutações de perda de função do gene já estão descritas em vários tipos de cancro como: cancro gástrico, adenoma pancreático, cancro do pulmão, cancro da próstata, cancro do colon e do trato digestivo, cancro dos ovários, meduloblastoma, glioma e carcinoma basocelular [75]. Concordantes com os resultados já descritos na literatura para tumores de CBC em geral, os resultados obtidos neste trabalho mostram que também os tumores de CBC provenientes de doentes com histórico de radioterapia apresentam perda no número de cópias do gene, o que será um fator essencial para a carcinogénese deste tipo de cancro cutâneo.

Os genes *SHOX* e *PPP2R3B* (Xp22.33) estão em regiões pseudoautosómicas do genoma, que são pequenas regiões de homologia entre os cromossomas X e Y dos mamíferos que se comportam como autossomas e sofrem recombinação durante a meiose, mais precisamente, estes genes estão situados na PAR1, no braço curto dos cromossomas [76].

O gene *PPP2R3B* (Xp22.33) codifica a subunidade reguladora β da proteína fosfatase A (PP2A), esta proteína é uma fosfatase de serina/treonina que se apresenta na forma de holoenzima trimérica, possui um domínio estrutural A, um domínio catalítico C e uma subunidade reguladora B, e desempenha um papel importante em vários processos biológicos como: regulação do ciclo celular, replicação de DNA, transcrição e tradução de sinal [77]. A subunidade reguladora é a parte da holoenzima que lhe

confere especificidade e atividade, em concreto a subunidade codificada pelo gene *PPP2R3B* pode apresentar-se na isoforma PR48 ou PR70 e tem um papel na regulação da fosforilação das proteínas Cdc6 e pRb envolvidas em mecanismos celulares essenciais [78]. Cdc6 é uma proteína que integra o complexo pré-replicação necessário para o início da replicação de DNA na fase S do ciclo celular e quando ativa encontra-se no estado fosforilado, a subunidade PR48 participa na regulação da replicação do DNA ao desfosforilar a proteína Cdc6, assim o complexo pré-replicação deixa de estar ativo e o processo para, impedindo assim que uma célula não pronta para divisão prossiga no ciclo celular [79]. A proteína retinoblastoma (pRb) é uma proteína inibidora do crescimento que se encontra desfosforilada quando ativa e inibe a entrada das células em fase S, o papel da PR70 é desfosforilar a pRb e portanto ativa-la sempre que a célula não está pronta para dividir, evitando assim a divisão celular [77]. Ao perceber um pouco como o gene *PPP2R3B* pode regular a replicação de DNA e o ciclo celular, é intuitivo entender que, quando este gene se encontra deletado, a proteína Cdc6 vai manter-se fosforilada e ativa e a proteína pRb vai manter-se fosforilada e inativa, o que vai levar a que a replicação de DNA e o ciclo celular prossigam mesmo que a célula não tenha condições para tal, o que consequentemente levará à progressão dos tumores. Assim é possível sugerir que o gene *PPP2R3B* poderá estar envolvido na progressão dos tumores de carcinoma basocelular em doentes com histórico de radioterapia.

O gene *SHOX* (Xp22.33) pertence a uma família de fatores de transcrição que podem funcionar como ativadores ou repressores da transcrição regulando temporariamente a expressão de genes alvo, em particular, o gene em estudo consegue induzir a paragem do ciclo celular e o início do processo apoptótico [80]. Os níveis mais elevados da expressão do gene *SHOX* são encontrados no tecido cartilágneo, o que mostra a forte associação ao desenvolvimento ósseo. Mutações de perda de função do gene estão descritas em várias síndromes em que os indivíduos afetados apresentam baixa estatura e problemas no desenvolvimento ósseo, como a Síndrome de Turner (OMIM 313000) e a Síndrome de Léri-Weill (OMIM127300) [81]. Conhecendo isto, seria de esperar que quando o gene se encontra amplificado, como nas amostras de tumores de carcinoma basocelular de doentes com histórico de radioterapia, ocorreria paragem do ciclo celular e início da apoptose, levando à morte das células alteradas, contudo, e sabendo que o funcionamento celular depende de muitos genes e moléculas, é possível entender que, apesar de se apresentar amplificado em várias amostras, o gene *SHOX* poderá não estar diretamente a influenciar a formação dos tumores de carcinoma basocelular.

4.1.3 Resultados MS-MLPA

Pela técnica de MS-MLPA foram analisadas as amostras tumorais e as não tumorais de todos os doentes do grupo, desta forma foi possível perceber se as amostras consideradas não tumorais, por serem macroscopicamente livres de tumor, eram molecularmente idênticas a tecido normal ou se já apresentavam algumas alterações genéticas e/ou epigenéticas características do tumor.

Esta técnica permite identificar simultaneamente variações no número de cópias e alterações no padrão de metilação dos genes. Os resultados obtidos para as variações no número de cópias mostraram um total de 70 alterações encontradas em 26 dos 38 genes estudados pelo painel ME002, destas, 89% foram identificadas em amostras tumorais e 11% em amostras não tumorais. Analisando os dados ao nível do tipo de alteração encontrada, no total do grupo, 61% das alterações são perdas no número de cópias dos genes estudados e 39% são ganhos, no conjunto de amostras tumorais também se verificou uma maior percentagem de perdas em relação aos ganhos, já no conjunto de amostras não tumorais foi observada uma percentagem de 50% para cada tipo de alteração. Fazendo a distinção por sexo, 83% das alterações foram encontradas em amostras do sexo feminino e os restantes 17% em amostras do sexo masculino, em ambos os sexos foram encontradas mais perdas do que ganhos no número de cópias dos genes estudados, e não foram identificadas alterações nas amostras não tumorais do sexo masculino.

Apenas numa das amostras não tumorais estudadas (CBC5 NT) foram encontradas variações no número de cópias (figura 4.3), contudo a amostra tumoral correspondente apresentou menos variações e apenas o ganho no gene *PAH* foi comum entre as duas amostras. Este resultado pode ser devido a algum erro de identificação ou troca de amostras e, portanto, deverão ser realizados estudos posteriores para perceber a origem dos resultados.

Aplicando o critério de seleção de alterações presentes em pelo menos 5 dos 14 doentes estudados, destacam-se os genes *VHL* e *PTCH1* como estando alterados em 6 e 7 doentes, respetivamente (figura 4.2).

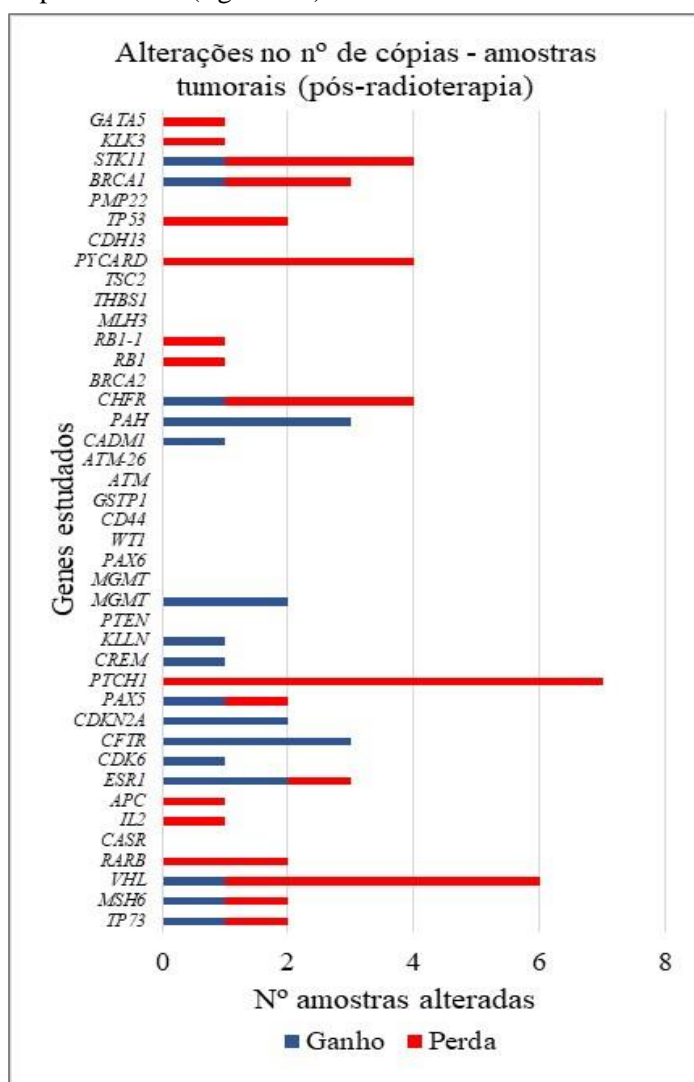


Figura 4.2. Gráfico representativo das alterações no número de cópias encontradas nas amostras tumorais do grupo de doentes com histórico de radioterapia, pela técnica de MS-MLPA. A vermelho estão representadas as perdas no número de cópias dos 38 genes estudados e a azul os respetivos ganhos encontrados.

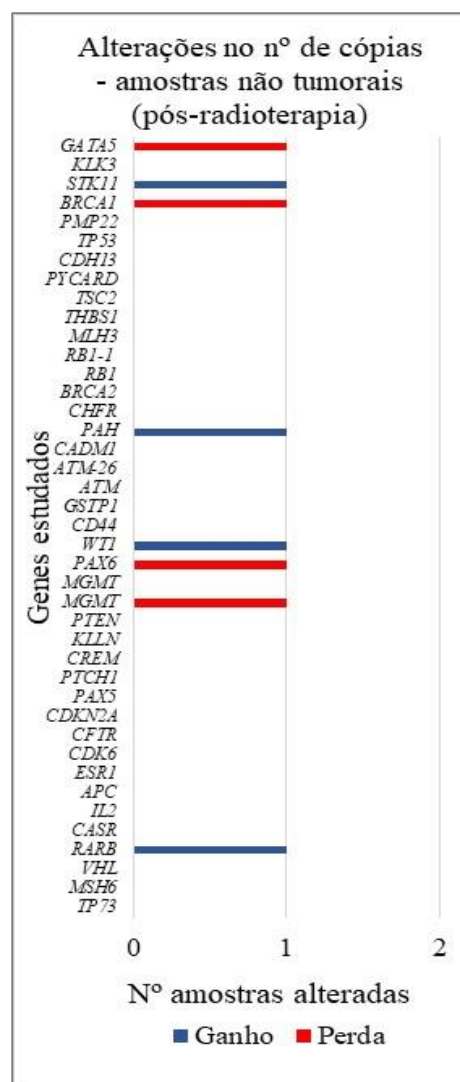


Figura 4.3. Gráfico representativo das alterações no número de cópias encontradas nas amostras não tumorais do grupo de doentes com histórico de radioterapia, pela técnica de MS-MLPA. A vermelho estão representadas as perdas no número de cópias dos 38 genes estudados e a azul os respetivos ganhos encontrados.

VHL é um gene supressor tumoral e a sua associação a tumores está relacionada com a inativação ou perda do gene, mutações de perda de função já foram identificadas em carcinomas renais esporádicos e em hemangioblastomas esporádicos [82]. Este gene codifica a proteína VHL que desempenha funções de *shuttle* entre o núcleo e o citoplasma e pertence ainda a um complexo de poliubiquitinação. Este complexo de poliubiquitinação, em situações normais de oxigenação, vai marcar o fator HIF [82] impedindo assim que sejam transcritos genes de resposta a hipoxia, como o *VEGF*, o *Glut-1*, o *PDGF*,

o *TGF α* e a eritropoetina [83]; em situação de hipoxia ou de ausência/inativação do gene *VHL*, o fator HIF não vai ser marcado por poliubiquitinação estando assim ativo e permitindo a transcrição de genes que vão cooperar na proliferação celular e ramificação dos vasos sanguíneos [82], contribuindo assim para a carcinogénese, por este motivo pode inferir-se que a perda do gene *VHL* contribui para a progressão dos tumores de carcinoma basocelular.

O gene *PTCH1*, já descrito na secção dos resultados obtidos por array-CGH para este grupo de amostras, é considerado um gene supressor tumoral e um potencial gene responsável pelo aparecimento dos tumores de carcinoma basocelular.

Relativamente aos resultados obtidos para as alterações no padrão de metilação dos genes, nas amostras controlo não se verificou nenhum gene com uma percentagem de metilação superior a 20%, e nas amostras de doentes apenas se observou metilação em 4 genes (*RARB*, *PAX5*, *CD44* e *TP53*) (figura 4.4). Os genes *RARB* e *PAX5* apareceram metilados em 2 amostras tumorais, o gene *CD44* em 3 amostras tumorais e 2 amostras não tumorais e por último o gene *TP53* apareceu metilado apenas numa amostra não tumoral.

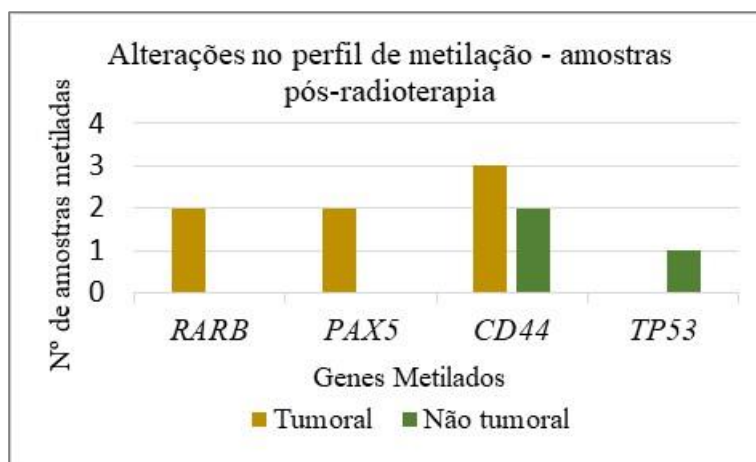


Figura 4.4. Representação gráfica dos genes apresentados metilados no grupo de doentes com histórico de radioterapia e o respetivo número de amostras, resultados obtidos pela técnica de MS-MLPA. O amarelo encontram-se representadas as amostras tumorais e a verde as amostras não tumorais.

O painel de sondas ME002 contém genes que se encontram comumente alterados em vários tipos de tumores, portanto é de esperar que os genes encontrados como estando metilados nas amostras de CBC analisadas tenham funções importantes na manutenção do bom funcionamento celular. O gene *RARB* desempenha funções na proliferação celular, na regulação do processo apoptótico e na regulação da transcrição génica (ensemble genes). O gene *PAX5* está associado à diferenciação celular e à regulação da transcrição de genes (ensemble genes). O *CD44* é um gene com funções de adesão celular, resposta a danos na cadeia de DNA e regulação da apoptose (ensemble genes). O gene *TP53*, gene supressor tumoral, desempenha variadas funções como a regulação da transcrição de genes e da expressão génica, a resposta a radiação UV e a consequentes danos no DNA e o controlo do ciclo celular, proliferação, diferenciação e apoptose (ensemble genes). Conhecendo os vários processos celulares considerados *hallmarks* do cancro, é possível sugerir que os genes encontrados metilados, nas amostras provenientes do grupo de doentes com histórico de radioterapia, e, portanto, cuja expressão está silenciada, podem influenciar a génese dos tumores de carcinoma basocelular, pois desempenham funções em processos celulares essenciais e reconhecidos como *hallmarks* do cancro.

Ao analisar os resultados relativos ao padrão de metilação dos genes estudados, foi possível reparar que um dado gene quando aparecia metilado numa amostra não tumoral também aparecia metilado, e com uma percentagem de metilação muito idêntica, na amostra tumoral correspondente, isto pode ser uma evidência de que o tecido não tumoral colhido pode já ter alterações epigenéticas que não são possíveis de detetar macroscopicamente. Contudo, esta premissa não se verificou para a amostra CBC5 NT, onde se observou metilação no gene *TP53* mas a amostra tumoral correspondente não apresentou metilação neste gene, o que leva a que futuramente devam ser realizados mais estudos para perceber a origem da alteração detetada.

4.1.4 Comparação

Após observar e analisar, comparando, os resultados obtidos por cada uma das técnicas realizadas, no grupo de amostras provenientes de doentes com histórico de radioterapia, apenas 4 (9p21.3; 9q21.11-q22.33; 16p11.2-p11.1; 17q21.31) das 17 regiões encontradas e definidas como alteradas a nível do número de cópias, pela técnica de array-CGH, são estudadas pelo painel de sondas utilizado na técnica de MS-MLPA, o que faz supor que o painel ME002 não será o mais indicado para futuros estudos do carcinoma basocelular. Contudo, também foi de notar que as técnicas utilizadas se complementam e assim possibilitam que sejam encontradas alterações novas e de maior tamanho (array-CGH) mas também alterações ao nível do nucleótido (MS-MLPA), isto permitiu identificar o gene *VHL* como potencial biomarcador do carcinoma basocelular, o que através do estudo apenas por array-CGH não seria possível, e ainda confirmar, por ambas as técnicas, que o gene *PTCH1* poderá estar envolvido na formação dos tumores, como já descrito na literatura

O estudo epigenético das amostras do grupo de doentes com histórico de radioterapia foi realizado apenas com um painel de sondas de MS-MLPA no qual foram destacados 3 genes metilados em amostras tumorais, desta forma seria importante o estudo da metilação de genes com outros painéis de sondas de MS-MLPA de forma a poder identificar mais genes metilados que poderão estar associados ao aparecimento de tumores de carcinoma basocelular.

4.2 Grupo doentes com tumores esporádicos

4.2.1 Caracterização do grupo

O grupo de doentes com tumores esporádicos é constituído por 14 doentes que desenvolveram carcinoma basocelular na face, uma região que é diariamente exposta à radiação solar e consequentemente à radiação ultravioleta que já se sabe ser um fator que induz alterações ao nível do DNA [44].

Os doentes deste grupo têm idades entre os 57 e os 87 anos, sendo a média de idades de 75,57 anos. Relativamente à distribuição de sexos, 8 dos 14 doentes são do sexo feminino (57%) e os restantes 6 do sexo masculino (43%). Também neste grupo, os dados relativos à idade dos doentes se apresentam de acordo com a literatura, uma vez que a média das idades se encontra igualmente no intervalo entre os 70 e os 79 anos, e relativamente ao sexo a percentagem de doentes mulheres é também superior à do sexo masculino, contrariamente ao que seria de esperar.

De cada doente que aceitou participar no estudo e foi inserido neste grupo, foi colhida uma amostra do tumor e uma amostra não tumoral colhida do tecido adjacente à margem do tumor e que se mostra macroscopicamente livre de tumor. Todos os doentes deste grupo apresentaram apenas um tumor na face até à data de colheita.

4.2.2 Resultados array-CGH

Pela técnica de array-CGH, também no grupo de doentes com tumores esporádicos, apenas as amostras tumorais foram estudadas.

Os resultados obtidos pela técnica de array-CGH permitiram encontrar variações no número de cópias ao longo de todo o genoma e identificar regiões alteradas em todos os cromossomas, quer autosomas quer cromossomas sexuais. A distribuição das alterações encontradas encontra-se representada, por amostra, no idiograma da figura 4.5.

Em geral foram encontradas um total de 259 alterações, o que corresponde a uma média de aproximadamente 19 alterações por amostra, estando distribuídas 123 (47%) alterações nas amostras do

sexo feminino e 136 (%) nas amostras do sexo masculino. Analisando os resultados ao nível do tipo de alteração encontrada, no geral do grupo, 42% das alterações foram perdas no número de cópias e 58% foram ganhos, contudo se esta análise for feita por sexo, nas mulheres foram identificadas 44 perdas (36%) e 79 ganhos (64%) enquanto nos homens aparecem os valores de 48% e 52% para perdas e ganhos no número de cópias, respetivamente.

Ao observar e analisar os resultados obtidos pela técnica de array-CGH detetámos algumas regiões cromossómicas que se salientaram por estarem alteradas em várias amostras, tais como: 3q26.1; 3q29; 5p15.33; 5q11.1; 8p11.22; 11q11; 17q21.31; Xq21.1, em perda no número de cópias e 2q37.3; 6p25.3; 12p13.31; 14q21.1; 14q32.33; 15q26.1, em ganho no número de cópias. As 14 alterações mencionadas acima foram selecionadas pelo critério anteriormente estabelecido para o grupo de doentes com histórico de radioterapia, isto é, presença da alteração em pelo menos 5 das 14 amostras estudadas dentro do grupo, o que corresponde a 31,75% das amostras do grupo.

De forma a conseguir reduzir os dados obtidos para cada uma das 14 regiões alteradas e selecionadas, foram encontrados os valores mínimos e comuns entre as amostras para os seguintes elementos: início da alteração, fim da alteração, tamanho da alteração e número e nome dos genes descritos para a região alterada, os resultados obtidos encontram-se organizados na tabela B dos anexos

Das 14 regiões alteradas estudadas, 6 não apresentam genes descritos, das restantes 8 regiões salientam-se os genes: *RNF168*, *FBXO45*, *PAK2*, *SENP5* e *DUSP22* como sendo os que possivelmente podem estar implicados na origem dos tumores de carcinoma basocelular em doentes com tumores esporádicos na face, uma vez que estão envolvidos em funções celulares relacionadas com os principais *hallmarks* do cancro.

O gene *RNF168* (3q29) codifica uma proteína E3 da família das ligases de ubiquitina que está envolvida no processo de degradação de proteínas e no processo de modificação da cromatina, este último é essencial para a sinalização das quebras na dupla cadeia de DNA e para a posterior funcionalidade dos complexos de reparação [84]. Mutações que levam ao silenciamento do gene *RNF168* já foram descritas para a síndrome de RIDDLE, caracterizada por sensibilidade a radiação, imunodeficiência, características dismórficas e dificuldades de aprendizagem [85]. Estudos feitos com ratinhos deficientes em *RNF168* mostraram que a falta deste gene leva a uma maior instabilidade genómica devido à falta de recrutamento de complexos de reparação do DNA, o que por sua vez leva a que os danos no DNA se mantenham e passem à geração seguinte [86]. Desta forma o gene *RNF168*, ao estar deletado nas amostras tumorais de CBC esporádico, pode ser um dos fatores que contribui para o aparecimento de tumores de carcinoma basocelular, uma vez que os mecanismos de reparação de quebras na cadeia dupla de DNA podem não estar devidamente funcionais, o que leva à acumulação de erros no DNA e posteriormente ao desenvolvimento de tumores.

O gene *FBXO45* (3q29) codifica uma proteína que integra um complexo de ligação de ubiquitina, desempenha um papel no desenvolvimento neuronal e tem ainda funções na degradação de proteínas codificadas por genes supressores tumorais através da proteólise mediada por ubiquitina [87]. *FBXO45* vai ubiquitinar a proteína Par-4, que é responsável por induzir a apoptose em células tumorais ou com defeito, a proteína Par-4 ao ser degradada já não vai exercer a sua função e as células anormais não morrem podendo proliferar e dar origem a carcinomas basocelular [88]. Faria sentido associar a amplificação do gene *FBXO45* ao aparecimento de tumores, pois a proteína Par-4 seria marcada para degradação, contudo, nas amostras tumorais de doentes com tumores esporádicos, o gene apresenta-se deletado, o que impede que seja inferida facilmente a sua participação na carcinogénese do carcinoma

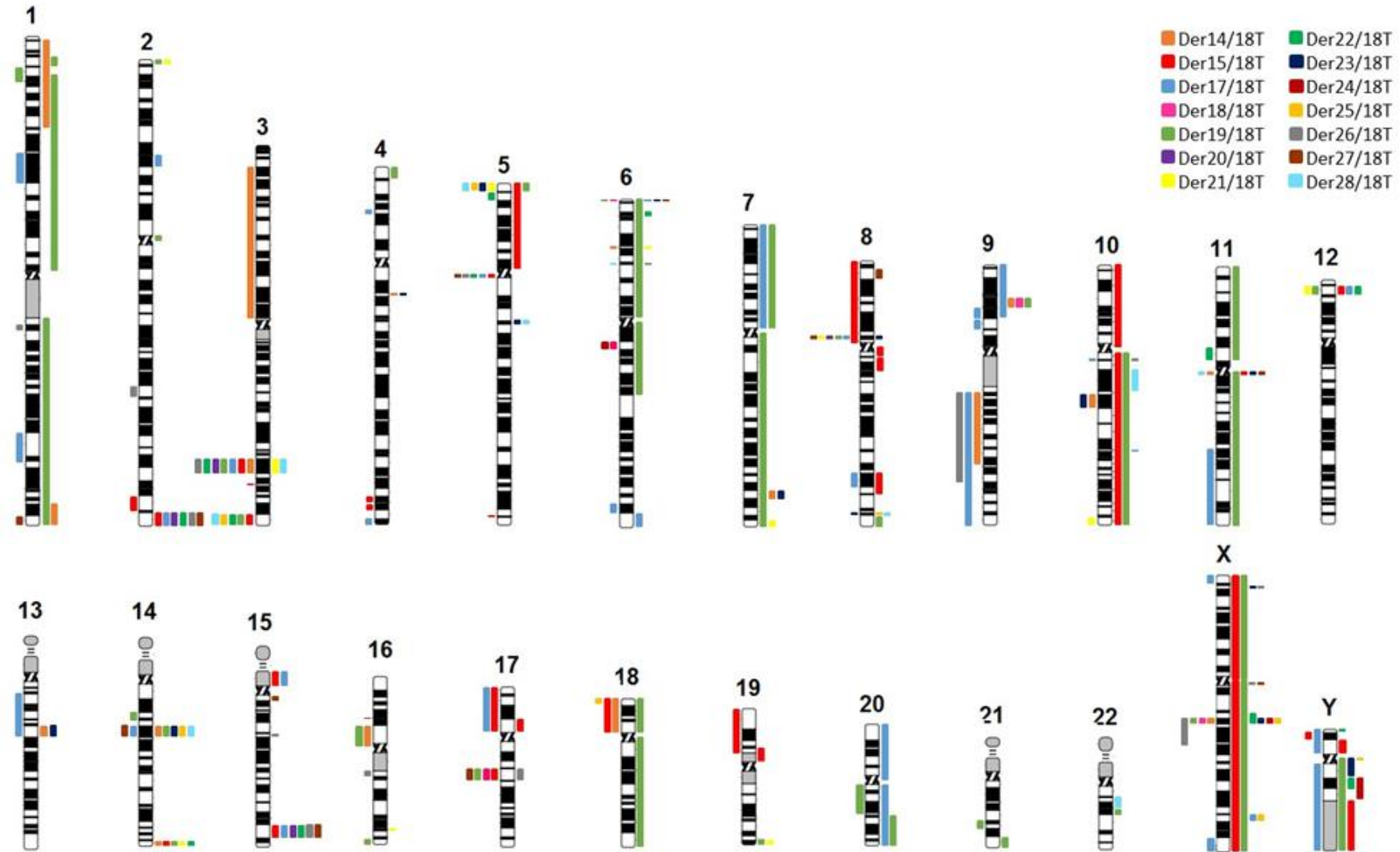


Figura 4.5. Idiograma representativo das alterações encontradas, pela técnica de array-CGH, nas amostras tumorais de carcinoma basocelular de doentes com tumores esporádicos. Cada cor representada corresponde a um dos 14 doentes estudados. As alterações apresentadas à esquerda dos cromossomas representam as perdas no número de cópias na posição correspondente, enquanto as alterações apresentadas à direita dos cromossomas representam os devidos ganhos no número de cópias.

basocelular, apesar de ser conhecido que numa só célula atuam várias moléculas simultaneamente e é o conjunto do funcionamento de todas elas que dita o estado da célula.

Os genes da família PAK codificam proteínas cinases de serina/treonina que estão envolvidas em múltiplos processos celulares, como a proliferação, a motilidade, a sobrevivência celular e a regulação do citoesqueleto [89]. O gene *PAK2* (3q29) já foi descrito em vários tipos de cânceres, como no cancro da mama e dos ovários [90], mas sempre como estando em ganho relativamente ao número de cópias, desta forma como nas amostras estudadas o gene foi observado em perda, não é possível fazer uma relação da alteração observada com a função do gene no aparecimento do carcinoma basocelular. Contudo ao saber-se que o gene está envolvido na regulação da via apoptótica, é fácil perceber que variações no número de cópias do gene levam a alterações no processo de morte celular programada, o que poderá ser uma das causas do aparecimento de CBC.

O gene *SENP5* (3q29) codifica uma protease SUMO-específica envolvida na regulação da SUMOilação, isto é, tem a função de remover proteínas SUMO de substratos conjugados alterando assim a sua atividade, função e localização celular. Desta forma o gene *SENP5* está envolvido na regulação de múltiplos processos celulares como: a transcrição, a replicação, a segregação cromossómica, o ciclo celular, a reparação de DNA e a apoptose [91], todos são mecanismos essenciais para o bom funcionamento das células e que aparecem muitas vezes alterados em células tumorais. Assim é fácil perceber que variações no número de cópias do gene e consequentemente alterações na sua expressão vão levar a alterações na célula podendo o gene *SENP5* ser um dos causadores do aparecimento de carcinoma basocelular. Contudo, estudos realizados em cancro da mama, carcinoma hepatocelular, carcinoma oral de células escamosas e osteossarcoma mostraram que o gene *SENP5* contribui para a tumorigénese quando se encontra em amplificação ou sobre-expresso e que quando o gene está deletado as células entram em apoptose ou têm um melhor prognóstico, portanto não é ainda possível tirar conclusões sobre a influência da perda do gene *SENP5* em amostras de carcinoma basocelular esporádico na formação dos tumores. [92, 93].

O gene *DUSP22* (6p25.3) também se encontra com variações no número de cópias nas amostras tumorais de doentes com histórico de radioterapia, assim a sua descrição e possível relação com a carcinogénese do carcinoma basocelular está demonstrada na secção dos resultados do primeiro grupo de amostras.

4.2.3 Resultados MS-MLPA

Pela técnica de MS-MLPA foram analisadas as amostras tumorais e as não tumorais de todos os doentes com tumores esporádicos, desta forma foi possível perceber se as amostras consideradas não tumorais, por serem macroscopicamente livres de tumor, eram tecido normal ou se já apresentavam algumas alterações genéticas e/ou epigenéticas características do tumor.

Esta técnica permite identificar simultaneamente variações no número de cópias e alterações no padrão de metilação. Os resultados obtidos para as variações no número de cópias mostraram um total de 92 alterações, encontradas em 34 dos 38 genes estudados pelo painel de sondas ME002, destas 78% foram identificadas em amostras tumorais e 22% em amostras não tumorais. Analisando os dados ao nível do tipo de alteração encontrada, 63% das alterações foram perdas no número de cópias dos genes estudados e 37% foram ganhos, em particular, quer no conjunto de amostras tumorais quer no de amostras não tumorais, também se verificou uma maior percentagem de perdas em relação aos ganhos. Fazendo a distinção por sexo, 52% das alterações foram encontradas em amostras do sexo feminino e 48% em amostras do sexo masculino, em

ambos os sexos foram encontradas mais perdas do que ganhos no número de cópias dos genes estudados, à exceção do conjunto de amostras não tumorais do sexo feminino que apresentaram maior número de ganhos do que de perdas.

Analisando as amostras não tumorais que apresentaram alterações no número de cópias (figura 4.7), foi de notar que a amostra CBC20 NT, nos genes que se verificaram alterados, apresentou as mesmas alterações que a amostra tumoral correspondente. Por outro lado, também foi possível observar que a amostra CBC22 NT apresentou um maior número de alterações do que a amostra tumoral correspondente.

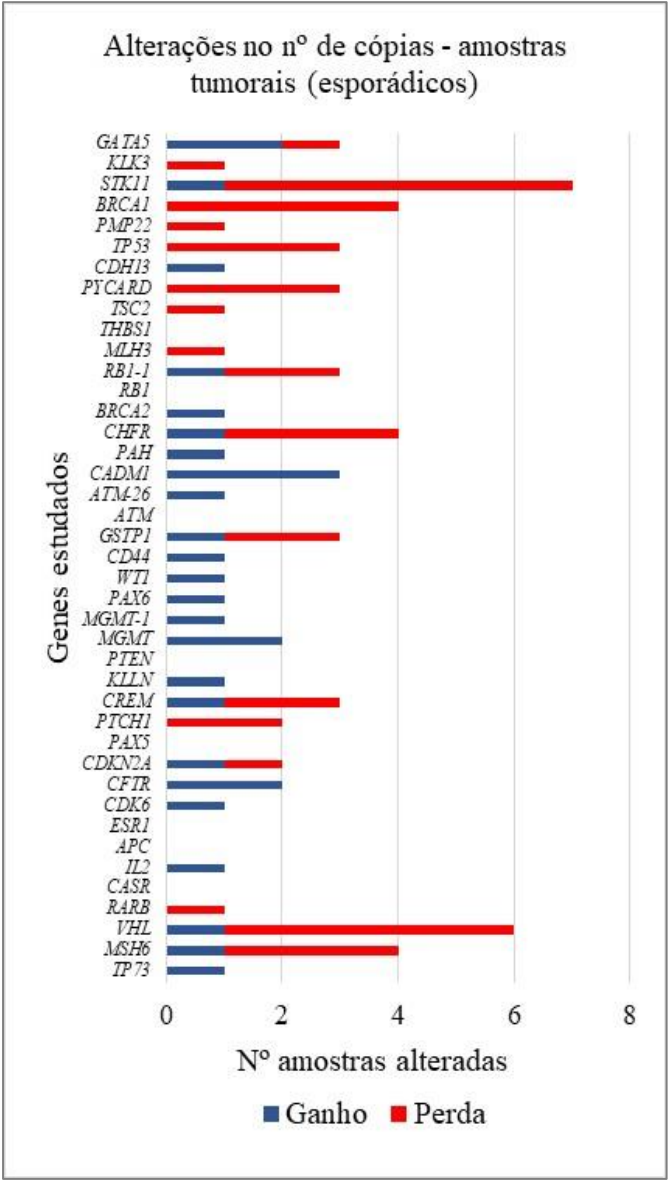


Figura 4.6. Gráfico representativo das alterações no número de cópias identificadas nas amostras tumorais do grupo de doentes com tumores esporádicos, pela técnica de MS-MLPA. A vermelho estão representadas as perdas no número de cópias dos 38 genes estudados e a azul os respectivos ganhos encontrados.

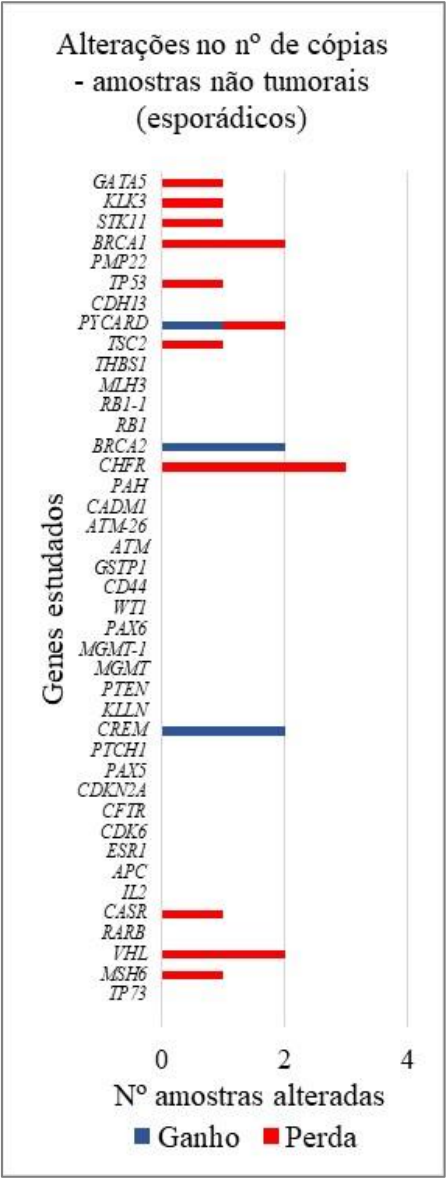


Figura 4.7. Gráfico representativo das alterações no número de cópias observadas nas amostras não tumorais do grupo de doentes com tumores esporádicos, pela técnica de MS-MLPA. A vermelho estão representadas as perdas no número de cópias dos 38 genes estudados e a azul os respectivos ganhos encontrados.

Aplicando o critério de seleção de alterações presentes em pelo menos 5 dos 14 doentes estudados, destacam-se os seguintes genes: *VHL*, alterado em 6 doentes; *CREM*, alterado em 5 doentes; *CHFR*, alterado em 6 doentes; *PYCARD*, alterado em 5 doentes; *STK11*, com alteração em 7 doentes (figura 4.6).

A função do gene *VHL* e a sua relação com o aparecimento de tumores de carcinoma basocelular já foi descrita na secção dos resultados obtidos, igualmente pela técnica de MS-MLPA, para o grupo de amostras provenientes de doentes com histórico de radioterapia.

O gene *CREM* pertence à família de fatores de transcrição CRE, pois codifica várias isoformas da proteína CREM, uma proteína de ligação ao DNA, da família de proteínas de ligação CRE, que tanto pode ter função de ativadora da transcrição como de repressora do processo. As proteínas CRE ligam-se a sequências CRE presentes em promotores de genes e ficam ativas depois de fosforiladas pela PKA [94]. Todas as proteínas CRE são formadas por uma região bZip e por uma P-box (local de fosforilação), os restantes domínios são específicos de cada proteína CRE e da função que desempenha. As proteínas CRE com função de ativadoras da transcrição, como é o caso da isoforma CREM τ , possuem dois domínios ricos em glutamina (domínios Q) que flanqueiam a caixa de fosforilação (P-box), quando estas proteínas são fosforiladas pela PKA, a sua conformação fica alterada ficando expostos os domínios Q, esta conformação vai permitir que os domínios ricos em glutamina interajam com a maquinaria de transcrição e assim o processo de transcrição seja ativado. No caso das proteínas CRE com função de repressão da transcrição, não existem domínios Q e, portanto, quando a PKA fosforila a proteína esta não vai formar as hélices necessárias para interagir com a maquinaria de transcrição e, portanto, o processo não é ativado, consequentemente o gene ao qual uma proteína CRE repressora está ligada não vai ser expresso[94]. Percebendo a base da função do gene *CREM* e da família de proteínas a ele associada, é possível entender que alterações na expressão normal do gene levarão à transcrição de genes normalmente silenciados e ao silenciamento de genes normalmente expressos, o que consequentemente pode levar à génese de tumores.

Testado em vários tipos celulares e organismos, o gene *CHFR* tem funções de supressor tumoral, uma vez que o seu silenciamento prolongado leva ao aparecimento de aneuploidias devido a uma segregação cromossómica desigual, o que mostra que o gene está envolvido na regulação da estabilidade genómica [95], um dos principais *hallmarks* do cancro. A proteína codificada pelo gene *CHFR* é uma ligase de ubiquitina e simultaneamente um *checkpoint* mitótico, pois verifica a formação e organização do fuso mitótico e a disposição dos cromossomas na placa metafásica. A proteína Aurora A, envolvida na formação do fuso mitótico e na organização e localização dos centrossomas, está presente em grandes quantidades no início da mitose, mais tarde quando os cromossomas estão dispostos corretamente na placa metafásica a função de ubiquitina da proteína CHFR é ativada e a proteína Aurora A é marcada e posteriormente degradada no proteossoma, reduzindo assim os seus níveis [95]. A deleção do gene *CHFR* já foi encontrada em cancro primário do pulmão, cancro do colon, carcinomas gástricos e do esófago e ainda em várias linhas celulares tumorais, paralelamente foi também identificada a amplificação do gene que codifica a proteína Aurora A [96]. Ao ser um dos genes que controla a instabilidade genómica da célula, qualquer alteração que modifique a sua expressão normal vai imediatamente interferir com o bom funcionamento da célula e das suas descendentes, o que irá levar a que outras alterações ocorram, contribuindo assim para o processo de carcinogénese, desta forma é possível associar as alterações encontradas no gene *CHFR* ao aparecimento de tumores esporádicos de carcinoma basocelular.

O gene *PYCARD* codifica a proteína ASC que é composta pela interação proteína-proteína de dois domínios, o domínio PYD no terminal-N e o domínio CARD no terminal-C. Proteínas com estes 2 domínios desempenham funções na resposta imunitária e na regulação da apoptose, logo mutações nos genes que as codificam estão associadas a doenças autoimunes e cancro [97]. O gene *PYCARD* é considerado supressor tumoral, pois a sua função normal é de promoção da apoptose através da ativação de caspases, como por exemplo a caspase9, perda do gene já foi encontrada em cancro da mama, mas metilação do promotor do gene, e consequente silenciamento, já foi reportada em cancro do pulmão, cancro colorretal, tumores ováricos, glioblastoma, neuroblastoma e melanoma [98]. Sendo a morte celular programada uma forma de controlar os erros e os danos celulares irreparáveis para que estes não passem à geração seguinte, quando alguma alteração genómica ou epigenética impede que genes reguladores deste processo atuem em normalidade, é compreensível que as células danificadas deem origem a células igualmente alteradas e assim se comece a formar um tumor, desta forma pode inferir-se que alterações no gene *PYCARD* podem estar associadas à génese de tumores esporádicos de carcinoma basocelular.

Para o gene *STK11* já foram descritas mutações que levam à síntese de proteínas truncadas, quando encontradas na linha germinativa são uma das causas genéticas da Síndrome de Peutz-Jeghers (OMIM 175200), na linha somática já foram encontradas em cancro do pulmão e em cancro cervical. Funcionalmente, o gene *STK11* regula o metabolismo energético e a polaridade celular, através da ativação de proteínas AMPK, estas proteínas quando ativas vão restaurar os níveis de ATP intracelular. A perda do gene ou a síntese de uma proteína truncada e, portanto, disfuncional, leva a que as proteínas AMPK não sejam ativadas e assim a célula tenha de aumentar a sua captação de glicose para através da glicólise conseguir recuperar os níveis de ATP e desta forma manter o seu nível energético [99]. A glicólise é o principal processo metabólico utilizado pelas células tumorais para obtenção de energia, então mutações no gene *STK11* são benéficas para os tumores pois levam ao aumento da captação de glicose para as células e assim permitir o crescimento e progressão dos tumores.

Relativamente aos resultados obtidos para as alterações no padrão de metilação dos genes, as amostras controlo não apresentaram valores de metilação superiores a 20% para qualquer gene, e nas amostras de doentes apenas se observou metilação em 5 genes (*RARB*, *MGMT*, *WT1*, *CD44* e *CDH13*) (figura 4.8). O gene *RARB* apareceu metilado em 2 amostras tumorais, o gene *MGMT* em 1 amostra tumoral e outra não tumoral, os genes *WT1* e *CDH13* apareceram metilados em apenas 1 amostra tumoral cada e por fim o gene *CD44* mostrou-se metilado em 2 amostras de cada conjunto, tumoral e não tumoral.

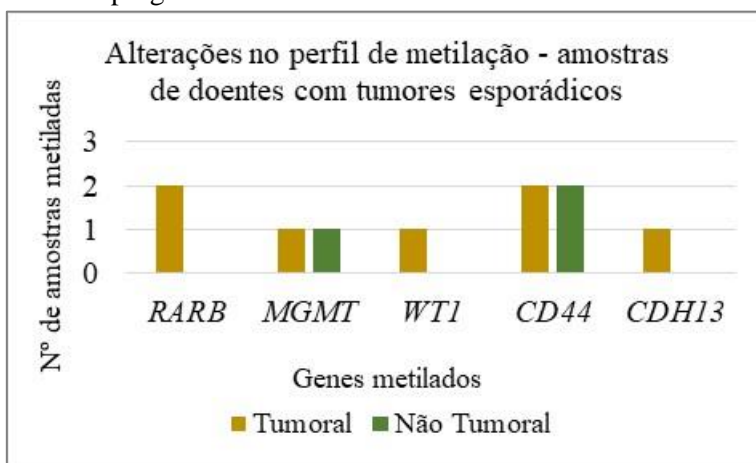


Figura 4.8. Representação gráfica dos genes apresentados metilados no grupo de doentes com tumores esporádicos e o respetivo número de amostras, resultados obtidos pela técnica de MS-MLPA. As amarelas representam as amostras tumorais e as verdes as amostras não tumorais.

De forma sucinta, o gene *MGMT* tem um papel na resposta ao stress oxidativo e à radiação ionizante, na reparação de danos na cadeia de DNA e na regulação da apoptose; o gene *WT1* desempenha funções na proliferação e diferenciação celulares e na regulação da transcrição de genes e do processo apoptótico; com funções no ciclo celular e proliferação, o gene *CDH13* tem ainda um papel importante na regulação da migração celular (ensemble genes). As principais funções dos genes *RARB* e *CD44* já foram descritas no grupo de amostras de tumores de doentes com histórico de radioterapia. Reparando nas funções desempenhadas pelos genes encontrados metilados nas amostras provenientes de doentes com tumores esporádicos podemos supor que alterações na sua função poderá estar na origem da formação dos tumores de carcinoma basocelular, uma vez que participam em várias vias consideradas *hallmarks* do cancro.

Ao analisar os resultados relativos ao padrão de metilação dos genes estudados, verificámos que um dado gene quando estava metilado numa amostra não tumoral também estava metilado, e com uma percentagem de metilação muito idêntica, na amostra tumoral correspondente, isto pode ser uma evidência de que o tecido não tumoral pode já ter alterações epigenéticas, que não são visíveis macroscopicamente.

4.2.4 Comparação

Após observar e analisar, comparando, os resultados obtidos por cada uma das técnicas realizadas, no grupo de amostras provenientes de doentes com tumores esporádicos, apenas 1 (17q21.31) das 14 regiões encontradas e definidas como alteradas a nível do número de cópias, pela técnica de array-CGH, é estudada pelo painel de sondas utilizado na técnica de MS-MLPA, o que faz querer que o painel ME002 não é o mais indicado para futuros estudos do carcinoma basocelular. Contudo, a complementaridade das técnicas utilizadas neste estudo possibilitou que fossem identificadas alterações nos genes *VHL*, *CREM*, *CHFR*, *PYCARD* e *STK11*, o que não seria possível se apenas tivesse sido utilizada a técnica de array-CGH, que não deteta alterações ao nível do nucleótido como a técnica de MS-MLPA.

O estudo da metilação de genes das amostras do grupo de doentes com tumores esporádicos foi realizado apenas com um painel de sondas de MS-MLPA no qual foram destacados 5 genes metilados em amostras tumorais dos 27 estudados, desta forma seria importante o estudo epigenético com outros painéis de sondas de MS-MLPA de forma a poder identificar mais genes metilados que poderão estar associados ao aparecimento de tumores esporádicos de carcinoma basocelular.

5 Comparação final/ Conclusões finais

Os resultados apresentados na secção anterior mostram que este estudo possibilitou a identificação de padrões de alterações dentro de cada grupo de doentes estudados assim como a identificação de padrões comuns entre os dois grupos.

Depois de observados, analisados e comparados os resultados relativos a variações no número de cópias obtidos para os dois grupos de amostras estudados, pelas técnicas de array-CGH e MS-MLPA, foi possível concluir que há um total de 10 regiões (2q37.3; 3q26.1; 5q11.1; 6p25.3; 8p11.22; 12p13.31; 14q32.33; 15q26.1; 17q21.31; Xq21.1), o que corresponde a 8 genes que se encontram em perda/ganho nas amostras de ambos os grupos estudados e que portanto podem ser identificados como possíveis biomarcadores do carcinoma basocelular. São de destacar os genes *DUSP22*, *FOXC1* e *VHL* que parecem ser essenciais para a génese e/ou progressão do

carcinoma basocelular pois desempenham um papel importante na regulação da homeostasia celular e a sua presença é evidente em qualquer um dos padrões moleculares identificados.

Note-se que o gene *PTCH1* foi identificado como sendo importante para o aparecimento do carcinoma basocelular em doentes com histórico de radioterapia, contudo não foi considerado parte integrante do padrão de alterações identificado para as amostras de CBC's esporádicos, o que vem contrariar algumas fontes bibliográficas que dizem que o gene *PTCH1* é um dos principais genes responsáveis pela formação do carcinoma basocelular. Isto pode ser elucidado ao perceber que o gene *PTCH1* é considerado o principal causador de CBC, quando em deleção, pois este gene é característico da síndrome de Gorlin-Goltz (OMIM 109400) que tem como uma das principais manifestações o aparecimento de múltiplos CBC's. Contudo também é preciso entender que este gene não é o único responsável pela síndrome de Gorlin-Goltz (OMIM 109400) e está associado ao aparecimento de CBC por conferir uma maior suscetibilidade à radiação, desta forma pode sugerir-se que a deleção no gene *PTCH1*, provocada pelos tratamentos com radioterapia, apenas confere maior suscetibilidade à radiação e que é necessária a presença de alterações noutros genes, provocadas por exposição à radiação UV, para que se formem os tumores.

Relativamente aos resultados obtidos para o padrão de metilação das amostras estudadas, destacam-se os genes *RARB* e *CD44* como sendo possíveis biomarcadores dos tumores de carcinoma basocelular quando metilados.

Ao perceber que o painel de sondas ME002 utilizado na técnica de MS-MLPA apenas permite o estudo de 4 e 1 regiões das encontradas pela técnica de array-CGH para os grupos de amostras de doentes com histórico de radioterapia e de amostras de doentes com tumores esporádicos, respetivamente, conclui-se que o painel selecionado não será o mais indicado para o estudo do carcinoma basocelular devendo ser utilizados outros painéis de forma a melhor caracterizar epigeneticamente este tipo de cancro cutâneo. Contudo, uma vez que o projeto realizado é pioneiro e não existem estudos moleculares do carcinoma basocelular publicados, tanto quanto é do nosso conhecimento, o painel de sondas escolhido foi considerado o mais adequado por ser um painel que engloba vários genes comumente encontrados em perda/ganho em vários tipos de cancro assim como encontrados metilados em diferentes tumores.

Apesar de o painel utilizado não se ter verificado o mais apropriado, o estudo das amostras por MS-MLPA, onde foram estudadas quer amostras tumorais quer não tumorais deste grupo, também permitiu perceber que, por vezes, o tecido considerado não tumoral e, portanto, macroscopicamente livre de tumor já apresenta alterações a nível genético que o clínico não consegue observar, o que leva a perceber que o diagnóstico molecular do carcinoma basocelular pode ser uma forma de garantir que todo o tecido tumoral é excisado e assim prevenir recidivas do tumor.

Futuramente, seria interessante realizar alguns estudos complementares de forma a encontrar um conjunto sólido de alterações características do carcinoma basocelular e genes associados a estas de forma a poder criar um painel de sondas de MS-MLPA específico para o CBC e assim facilitar futuros diagnósticos e prognósticos. O estudo da função dos genes no desenvolvimento de CBC, principalmente daqueles que se observaram com o mesmo tipo de alteração em ambos os grupos de amostras, será no futuro um passo a seguir pois possibilitará perceber especificamente que vias celulares são afetadas e assim auxiliar a que sejam idealizadas e formuladas novas terapêuticas direcionadas e não invasivas.

6 Referências Bibliográficas

1. Rubin, A.I., *et al.* (2005), "*Basal-cell carcinoma*". N Engl J Med, 353(21): p. 2262-9.
2. Ormerod, A., *et al.* (2010), "*Basal cell carcinoma*". BMJ Clin Evid, 2010: p. 1719.
3. Brooke, R.C. (2005), "*Basal cell carcinoma*". Clin Med (Lond), 5(6): p. 551-4.
4. Lomas, A., *et al.* (2012), "*A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer*". Br J Dermatol, 166(5): p. 1069-80.
5. Jensen, U.B., *et al.* (1999), "*The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis*". Development, 126(11): p. 2409-18.
6. Wong, C.S., *et al.* (2003), "*Basal cell carcinoma*". BMJ, 327(7418): p. 794-8.
7. Finan Templeton Dermatopathology Associates. 2016 [cited 2018 04 Out]; Available from: <http://finantempleton.com/patient-information/patient-education/basal-cell-carcinoma>.
8. Memorang, Inc. 2018 [cited 2018 04 Out]; Available from: <https://www.memorangapp.com/flashcards/129634/Non-Melanoma+Skin+Cancer/>.
9. Scrivener, Y., *et al.* (2002), "*Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype*". Br J Dermatol, 147(1): p. 41-7.
10. Hassanpour, S.E., *et al.* (2006), "*Basal cell carcinoma of scalp in patients with history of childhood therapeutic radiation: a retrospective study and comparison to nonirradiated patients*". Ann Plast Surg, 57(5): p. 509-12.
11. Armstrong, B.K. and A. Krickler (2001), "*The epidemiology of UV induced skin cancer*". J Photochem Photobiol B, 63(1-3): p. 8-18.
12. Chinem, V.P. and H.A. Miot (2011), "*Epidemiology of basal cell carcinoma*". An Bras Dermatol, 86(2): p. 292-305.
13. Katalinic, A., *et al.* (2003), "*Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer)*". Br J Dermatol, 149(6): p. 1200-6.
14. Buettner, P.G. and B.A. Raasch (1998), "*Incidence rates of skin cancer in Townsville, Australia*". Int J Cancer, 78(5): p. 587-93.
15. Demers, A.A., *et al.* (2005), "*Trends of nonmelanoma skin cancer from 1960 through 2000 in a Canadian population*". J Am Acad Dermatol, 53(2): p. 320-8.
16. Harris, R.B., *et al.* (2001), "*Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancers in southeastern Arizona, 1985-1996*". J Am Acad Dermatol, 45(4): p. 528-36.
17. Hannuksela-Svahn, A., *et al.* (1999), "*Basal cell skin carcinoma and other nonmelanoma skin cancers in Finland from 1956 through 1995*". Arch Dermatol, 135(7): p. 781-6.
18. Holme, S.A., *et al.* (2000), "*Changing trends in non-melanoma skin cancer in South Wales, 1988-98*". Br J Dermatol, 143(6): p. 1224-9.
19. Karagas MR, J.A., Greenberg ER, Stukel TA, Weiss JE, Baron JA, *et al* (1996), "*Risk of basal cell and squamous cell skin cancers after ionizing radiation therapy for the Skin Cancer Prevention Study Group*". J Natl Cancer Inst, 88(24): p. 1848-53.
20. Lichter, M.D., *et al.* (2000), "*Therapeutic ionizing radiation and the incidence of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. The New Hampshire Skin Cancer Study Group*". Arch Dermatol, 136(8): p. 1007-11.
21. Euvrard, S., *et al.* (2003), "*Skin cancers after organ transplantation*". N Engl J Med, 348(17): p. 1681-91.
22. Castori, M., *et al.* (2012), "*Genetic skin diseases predisposing to basal cell carcinoma*". Eur J Dermatol, 22(3): p. 299-309.

23. da Paz Oliveira, G., *et al.* (2017), "*Teaching NeuroImages: Clinical and neuroimaging features in Gorlin-Goltz syndrome*". *Neurology*, 88(7): p. e53-e54.
24. Nikolaou, V., *et al.* (2012), "*Hereditary nonmelanoma skin cancer*". *Semin Cutan Med Surg*, 31(4): p. 204-10.
25. Adolphe, C., *et al.* (2006), "*Patched1 functions as a gatekeeper by promoting cell cycle progression*". *Cancer Res*, 66(4): p. 2081-8.
26. van Steensel, M.A., *et al.* (2001), "*A case of Rombo syndrome*". *Br J Dermatol*, 144(6): p. 1215-8.
27. Parren, L.J., *et al.* (2011), "*Linkage refinement of Bazex-Dupre-Christol syndrome to an 11.4-Mb interval on chromosome Xq25-27.1*". *Br J Dermatol*, 165(1): p. 201-3.
28. Pousti, A. (1979), "*Malignant tumours of the scalp resulting from X-ray treatment of tinea capitis*". *Br J Plast Surg*, 32(1): p. 52-4.
29. Shore, R.E., *et al.* (1984), "*Skin cancer incidence among children irradiated for ringworm of the scalp*". *Radiat Res*, 100(1): p. 192-204.
30. Zargari, O. (2015), "*Radiation-induced basal cell carcinoma*". *Dermatol Pract Concept*, 5(2): p. 109-12.
31. Ron, E., *et al.* (1991), "*Radiation-induced skin carcinomas of the head and neck*". *Radiat Res*, 125(3): p. 318-25.
32. Greenman, C., *et al.* (2007), "*Patterns of somatic mutation in human cancer genomes*". *Nature*, 446(7132): p. 153-8.
33. Pleasance, E.D., *et al.* (2010), "*A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome*". *Nature*, 463(7278): p. 191-6.
34. Alexandrov, L.B., *et al.* (2013), "*Signatures of mutational processes in human cancer*". *Nature*, 500(7463): p. 415-21.
35. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler (2004), "*Cancer genes and the pathways they control*". *Nat Med*, 10(8): p. 789-99.
36. Homig-Holzel, C. and S. Savola (2012), "*Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics*". *Diagn Mol Pathol*, 21(4): p. 189-206.
37. Baylin, S.B. and J.G. Herman (2000), "*DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics*". *Trends Genet*, 16(4): p. 168-74.
38. Jones, P.A. and S.B. Baylin (2007), "*The epigenomics of cancer*". *Cell*, 128(4): p. 683-92.
39. Schubeler, D. (2015), "*Function and information content of DNA methylation*". *Nature*, 517(7534): p. 321-6.
40. Nygren, A.O., *et al.* (2005), "*Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences*". *Nucleic Acids Res*, 33(14): p. e128.
41. Little, J.B. (2000), "*Radiation carcinogenesis*". *Carcinogenesis*, 21(3): p. 397-404.
42. Matsumura, Y. and H.N. Ananthaswamy (2004), "*Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin*". *Toxicol Appl Pharmacol*, 195(3): p. 298-308.
43. Lear, J.T., *et al.* (1997), "*Re: relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma*". *J Natl Cancer Inst*, 89(6): p. 454-5.
44. Gailani, M.R., *et al.* (1996), "*Relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma*". *J Natl Cancer Inst*, 88(6): p. 349-54.
45. Mizuno, T., *et al.* (2006), "*Molecular basis of basal cell carcinogenesis in the atomic-bomb survivor population: p53 and PTCH gene alterations*". *Carcinogenesis*, 27(11): p. 2286-94.

46. Boaventura, P., *et al.* (2014), "*Mitochondrial D310 D-Loop instability and histological subtypes in radiation-induced cutaneous basal cell carcinomas*". *J Dermatol Sci*, 73(1): p. 31-9.
47. Silverman, M.K., *et al.* (1992), "*Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 4: X-ray therapy*". *J Dermatol Surg Oncol*, 18(7): p. 549-54.
48. Von Hoff, D.D., *et al.* (2009), "*Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma*". *N Engl J Med*, 361(12): p. 1164-72.
49. Carreira, I.M., *et al.* (2015), "*Copy number variants prioritization after array-CGH analysis - a cohort of 1000 patients*". *Mol Cytogenet*, 8: p. 103.
50. Redon, R., *et al.* (2006), "*Global variation in copy number in the human genome*". *Nature*, 444(7118): p. 444-54.
51. Shaffer, L.G., *et al.* (2007), "*Microarray analysis for constitutional cytogenetic abnormalities*". *Genet Med*, 9(9): p. 654-62.
52. Redon, R., *et al.* (2009), "*Comparative genomic hybridization: DNA labeling, hybridization and detection*". *Methods Mol Biol*, 529: p. 267-78.
53. Shinawi, M. and S.W. Cheung (2008), "*The array CGH and its clinical applications*". *Drug Discov Today*, 13(17-18): p. 760-70.
54. Davies, J.J.W., Ian M. Lam, Wan L. (2005), "*Array CGH technologies and their applications to cancer genomes*". *Chromosome Research*, 13: p. 237-248.
55. Colaianni, V., *et al.* (2016), "*Copy number variations and stroke*". *Neurol Sci*, 37(12): p. 1895-1904.
56. Freed, D., *et al.* (2014), "*Somatic mosaicism in the human genome*". *Genes (Basel)*, 5(4): p. 1064-94.
57. Robberecht, C., *et al.* (2010), "*Piecing together the problems in diagnosing low-level chromosomal mosaicism*". *Genome Med*, 2(7): p. 47.
58. Lee, C.N., *et al.* (2012), "*Clinical utility of array comparative genomic hybridisation for prenatal diagnosis: a cohort study of 3171 pregnancies*". *BJOG*, 119(5): p. 614-25.
59. Allemeersch, J., *et al.* (2009), "*An experimental loop design for the detection of constitutional chromosomal aberrations by array CGH*". *BMC Bioinformatics*, 10: p. 380.
60. Schouten, J.P., *et al.* (2002), "*Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*". *Nucleic Acids Res*, 30(12): p. e57.
61. Ribeiro, I.P., *et al.* (2014), "*Genetic gains and losses in oral squamous cell carcinoma: impact on clinical management*". *Cell Oncol (Dordr)*, 37(1): p. 29-39.
62. *High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics GmbH, Germany*. 2008; Available from: https://lifescience.roche.com/en_pt/products/high-pure-pcr-template-preparation-kit.html#documents.
63. *Agilent SurePrint G3 Human Catalog CGH Microarrays, Agilent Technologies, USA*. 2015.
64. *SureTag Complete DNA Labeling Kit, Agilent Technologies, USA*. 2015; Available from: https://www.agilent.com/cs/library/datasheets/public/5990-8682EN_lo.pdf.
65. *General MS-MLPA protocol for the detection and quantification of nucleic acid sequences and methylation profiling, MSP-v006, by MRC-Holland Amsterdam, The Netherlands*. 2016; Available from: https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_w12zCji-rCGANQgZPuTixtCplCA1mmwJoFo_xHPnTgc.

66. SALSA MLPA probemix ME002-C1 Tumour suppressor mix 2, Description 23, MRC Holland Amsterdam, The Netherlands. 2016; Available from: <http://mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=tUSqCGOFOoI>.
67. Yu, D., et al. (2015), "Decreased expression of dual specificity phosphatase 22 in colorectal cancer and its potential prognostic relevance for stage IV CRC patients". *Tumour Biol*, 36(11): p. 8531-5.
68. Sekine, Y., et al. (2007), "DUSP22/LMW-DSP2 regulates estrogen receptor-alpha-mediated signaling through dephosphorylation of Ser-118". *Oncogene*, 26(41): p. 6038-49.
69. Nunes-Xavier, C., et al. (2011), "Dual-specificity MAP kinase phosphatases as targets of cancer treatment". *Anticancer Agents Med Chem*, 11(1): p. 109-32.
70. Sizemore, S.T. and R.A. Keri (2012), "The forkhead box transcription factor FOXC1 promotes breast cancer invasion by inducing matrix metalloprotease 7 (MMP7) expression". *J Biol Chem*, 287(29): p. 24631-40.
71. Wang, J., et al. (2012), "FOXC1 regulates the functions of human basal-like breast cancer cells by activating NF-kappaB signaling". *Oncogene*, 31(45): p. 4798-802.
72. Lee, Y., et al. (2010), "Network modeling identifies molecular functions targeted by miR-204 to suppress head and neck tumor metastasis". *PLoS Comput Biol*, 6(4): p. e1000730.
73. Zhu, X., et al. (2017), "IL-6R/STAT3/miR-204 feedback loop contributes to cisplatin resistance of epithelial ovarian cancer cells". *Oncotarget*, 8(24): p. 39154-39166.
74. Bhattacharya, R., et al. (2008), "Role of hedgehog signaling in ovarian cancer". *Clin Cancer Res*, 14(23): p. 7659-66.
75. Katoh, Y. and M. Katoh (2005), "Hedgehog signaling pathway and gastric cancer". *Cancer Biol Ther*, 4(10): p. 1050-4.
76. Helena Mangs, A. and B.J. Morris (2007), "The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future". *Curr Genomics*, 8(2): p. 129-36.
77. Magenta, A., et al. (2008), "Protein phosphatase 2A subunit PR70 interacts with pRb and mediates its dephosphorylation". *Mol Cell Biol*, 28(2): p. 873-82.
78. Eichhorn, P.J., et al. (2009), "Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer". *Biochim Biophys Acta*, 1795(1): p. 1-15.
79. Yan, Z., et al. (2000), "PR48, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with Cdc6 and modulates DNA replication in human cells". *Mol Cell Biol*, 20(3): p. 1021-9.
80. Blaschke, R.J. and G. Rappold (2006), "The pseudoautosomal regions, SHOX and disease". *Curr Opin Genet Dev*, 16(3): p. 233-9.
81. Marchini, A., et al. (2004), "The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes". *J Biol Chem*, 279(35): p. 37103-14.
82. Kim, W.Y. and W.G. Kaelin (2004), "Role of VHL gene mutation in human cancer". *J Clin Oncol*, 22(24): p. 4991-5004.
83. Linehan, W.M., et al. (2003), "The genetic basis of cancer of the kidney". *J Urol*, 170(6 Pt 1): p. 2163-72.
84. Devgan, S.S., et al. (2011), "Homozygous deficiency of ubiquitin-ligase ring-finger protein RNF168 mimics the radiosensitivity syndrome of ataxia-telangiectasia". *Cell Death Differ*, 18(9): p. 1500-6.
85. Stewart, G.S., et al. (2007), "RIDDLE immunodeficiency syndrome is linked to defects in 53BP1-mediated DNA damage signaling". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(43): p. 16910-5.

86. Bohgaki, T., *et al.* (2011), "*Genomic instability, defective spermatogenesis, immunodeficiency, and cancer in a mouse model of the RIDDLE syndrome*". PLoS Genet, 7(4): p. e1001381.
87. Kogure, N., *et al.* (2017), "*Low Expression of FBXO45 Is Associated with Gastric Cancer Progression and Poor Prognosis*". Anticancer Res, 37(1): p. 191-196.
88. Wang, Z. and W. Wei (2014), "*Fbxo45 joins the 'Par-4'ty in controlling apoptosis of cancer cells*". Cell Death Differ, 21(10): p. 1508-10.
89. Radu, M., *et al.* (2014), "*PAK signalling during the development and progression of cancer*". Nat Rev Cancer, 14(1): p. 13-25.
90. Dummer, B., *et al.* (2009), "*Pak protein kinases and their role in cancer*". Cancer Metastasis Rev, 28(1-2): p. 51-63.
91. Gareau, J.R. and C.D. Lima (2010), "*The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition*". Nat Rev Mol Cell Biol, 11(12): p. 861-71.
92. Jin, Z.L., *et al.* (2016), "*The SUMO-specific protease SENP5 controls DNA damage response and promotes tumorigenesis in hepatocellular carcinoma*". Eur Rev Med Pharmacol Sci, 20(17): p. 3566-73.
93. Ding, X., *et al.* (2008), "*Overexpression of SENP5 in oral squamous cell carcinoma and its association with differentiation*". Oncol Rep, 20(5): p. 1041-5.
94. Lalli, E. and P. Sassone-Corsi (1994), "*Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP*". J Biol Chem, 269(26): p. 17359-62.
95. Privette, L.M., *et al.* (2008), "*Loss of CHFR in human mammary epithelial cells causes genomic instability by disrupting the mitotic spindle assembly checkpoint*". Neoplasia, 10(7): p. 643-52.
96. Yu, X., *et al.* (2005), "*Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation*". Nat Genet, 37(4): p. 401-6.
97. McConnell, B.B. and P.M. Vertino (2004), "*TMS1/ASC: the cancer connection*". Apoptosis, 9(1): p. 5-18.
98. Das, P.M., *et al.* (2006), "*Methylation mediated silencing of TMS1/ASC gene in prostate cancer*". Mol Cancer, 5: p. 28.
99. Gill, R.K., *et al.* (2011), "*Frequent homozygous deletion of the LKB1/STK11 gene in non-small cell lung cancer*". Oncogene, 30(35): p. 3784-91.

Anexos

Anexo A - Tabela resumo das principais alterações encontradas nas amostras tumorais do grupo de doentes com histórico de radioterapia, pela técnica de array-CGH. Na coluna que contém os genes afetados pela alteração em cada posição cromossômica, estão destacados a negrito aqueles que, pela função que desempenham no funcionamento celular, poderão estar associados à carcinogénese do carcinoma basocelular. NOTA: para aposição q21.11-q22.33 do cromossoma 9 apenas estão descritos os genes afetados que poderão estar implicados na carcinogénese, apesar de abranger 148 genes no total.

| Cromossoma | Posição | Alteração | Nº de amostras | % de amostras | Início | Fim | Tamanho (pb) | Genes afetados |
|------------|-----------------|-----------|----------------|---------------|-----------|-----------|--------------|---|
| 2 | q37.3 | P | 3 | 57,1 | 242920211 | 242948040 | 27829 | |
| | | G | 5 | | 242856588 | 243028452 | 171864 | |
| 3 | q26.1 | P | 8 | 57,1 | 162584547 | 162619141 | 34594 | |
| 4 | q13.2 | P | 7 | 50 | 69375140 | 69483277 | 108137 | UGT2B17, UGT2B15 |
| 5 | q11.1 | P | 6 | 35,7 | 49584189 | 50510417 | 926228 | EMB, PARP8 |
| 6 | p25.3 | P | | 57,1 | 259318 | 293615 | 34297 | DUSP22 |
| | | G | | | 1611194 | 1611489 | 295 | FOXC1 |
| 8 | p11.22 | P | 5 | 35,7 | 39237438 | 39362887 | 125449 | ADAM5P, ADAM3A |
| 9 | p21.3 | G | 10 | 71,4 | 25259013 | 25346971 | 87958 | |
| 9 | q21.11 - q22.33 | P | 9 | 64,3 | 71133273 | 99573506 | 28440233 | PGM5, PRKACG, FXN, SMC5, KLF9, ANXA1, PCSK5, RFK, PRUNE2, FOXB2, GNAQ, CEP78, FRMD3, KIF27, RMI1, NAA35, GAS1, SPIN1, CKS2, SEMA4D, GADD45G, OGN, BICD2, FGD3, FANCC, PTCH1, (...) |
| 12 | p13.31 | G | 10 | 71,4 | 9637323 | 9687899 | 50576 | |
| 14 | q32.33 | G | 5 | 35,7 | 107148739 | 107281934 | 133195 | |
| 15 | q11.2 | G | 6 | 42,9 | 25333163 | 25333758 | 595 | |
| 15 | q26.1 | G | 7 | 50 | 94150634 | 94233969 | 83335 | |
| 16 | p11.2 - p11.1 | P | 5 | 35,7 | 34482042 | 34701983 | 219941 | LOC283914 |
| 17 | q21.31 | P | 5 | 57,1 | 44171888 | 44351152 | 179264 | KIAA1267 |
| | | G | 3 | | 44207977 | 44261359 | 53382 | KIAA1267 |
| X | p22.33 | P | 2 | 42,9 | 296520 | 4015762 | 3719242 | PPP2R3B |
| | | G | 4 | | 603582 | 604832 | 1250 | SHOX |
| X | q21.1 | P | 7 | 50 | 77121844 | 77123829 | 1985 | MAGT1 |
| Y | p11.32 | P | 1 | 42,9 | 246520 | 400949 | 154429 | PPP2R3B |
| | | G | 5 | | 553582 | 554832 | 1250 | SHOX |

Anexo B - Tabela resumo das principais alterações encontradas no grupo de amostras de doentes com tumores esporádicos, pela técnica de array-CGH. Na coluna que contém os genes afetados pela alteração em cada posição cromossômica, estão destacados a negrito aqueles que, pela função que desempenham no funcionamento celular, poderão estar associados à carcinogénese do carcinoma basocelular.

| Cromossoma | Posição | Alteração | nº de amostras | % de amostras | Início | Fim | Tamanho (pb) | Genes afetados |
|------------|---------|-----------|----------------|---------------|-----------|-----------|--------------|--|
| 2 | q37.3 | G | 6 | 42,9 | 242856588 | 243028452 | 171864 | |
| 3 | q26.1 | P | 9 | 64,3 | 162584547 | 162619141 | 34594 | |
| 3 | q29 | P | 5 | 35,7 | 195974097 | 196665087 | 690990 | <i>PCYT1A</i> , <i>TCTEX1D2</i> , <i>TM4SF19</i> , <i>UBXN7</i> , <i>RNF168</i> , <i>C3orf43</i> , <i>WDR53</i> , <i>FBXO45</i> , <i>LRRC33</i> , <i>C3orf34</i> , <i>PIGX</i> , <i>PAK2</i> , <i>SENP5</i> , <i>NCBP2</i> |
| 5 | p15.33 | P | | 35,7 | 759169 | 821938 | 62769 | <i>ZDHC11</i> |
| | | G | 1 | | 22149 | 144019 | 121870 | <i>PLEKHG4B</i> |
| 5 | q11.1 | P | 5 | 35,7 | 49584189 | 50484045 | 899856 | <i>EMB</i> , <i>PARP8</i> |
| 6 | p25.3 | P | 2 | 35,7 | 259318 | 293493 | 34175 | <i>DUSP22</i> |
| | | G | 3 | | 259318 | 293615 | 34297 | |
| 8 | p11.22 | P | 7 | 50 | 39237438 | 39362887 | 125449 | <i>ADAM5P</i> , <i>ADAM3A</i> |
| 11 | q11 | P | 5 | 35,7 | 55385617 | 55450788 | 65171 | <i>OR4P4</i> , <i>OR4S2</i> , <i>OR4C6</i> |
| 12 | p13.31 | G | 5 | 35,7 | 9637323 | 9687899 | 50576 | |
| 14 | q21.1 | G | 7 | 50 | 41621369 | 41657239 | 35870 | |
| 14 | q32.33 | G | 5 | 35,7 | 107185453 | 107185512 | 59 | |
| 15 | q26.1 | G | 6 | 42,9 | 94150634 | 94233969 | 83335 | |
| 17 | q21.31 | P | 4 | 35,7 | 43593476 | 43655806 | 62330 | |
| | | G | 1 | | 44171888 | 44351152 | 179264 | <i>KIAA1267</i> |
| X | q21.1 | P | 8 | 57,1 | 77121844 | 77123829 | 1985 | <i>MAGT1</i> |